



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MICHELLE DIAS HORNES DA ROSA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS MICROALGAIS SOBRE CÉLULAS DE
MELANOMA B16-F10

CURITIBA

2018

MICHELLE DIAS HORNES DA ROSA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS MICROALGAIS SOBRE CÉLULAS DE
MELANOMA B16-F10

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniel Nosedá

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá

Coorientadora: Profa. Dra. Célia Regina Cavichiolo Franco

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

R788a Rosa, Michelle Dias Homes da
Atividade biológica de extratos microalgais sobre células de melanoma B16-F10 / Michelle Dias
Homes da Rosa. – Curitiba, 2018.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2018.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Daniele Nosedá.
Coorientadoras: Profa. Dra. Maria Eugênia Duarte Nosedá; Profa. Dra. Célia Regina Cavichiole
Franco.

1. Melanoma. 2. Microalgas. 3. Extrato aquoso das microalgas. 4. Glicosídeos.
5. Heteropolissacarídeos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Nosedá, Miguel Daniele.
III. Nosedá, Maria Eugênia Duarte. IV. Franco, Célia Regina Cavichiole. V. Título.

CDD: 660.65

Bibliotecária: Romilda Santos - CRB-9/1214



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE
BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação do Mestrado de MICHELLE DIAS HORNES DA ROSA intitulada: "Atividade biológica de extratos microalgais sobre células de melanoma B16F10", após terem ouvido a autora e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pelo seu APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo Colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das normas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 27 de Abril de 2018.

MIGUEL DANIEL NOSEDA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Externo (UFPR)

STELLEY MARCELA PETRIS B. SOMA

Avaliador Externo (UFPR)

*Dedico este trabalho aos pacientes com
câncer e a todas as pessoas que
futuramente possam se beneficiar dos
resultados aqui obtidos.*

AGRADECIMENTOS

Foi uma honra e um privilégio poder desenvolver este trabalho nestes dois anos, enquanto eu também me desenvolvia.

Sou grata por morar em um país que ainda me oportuniza esta pós-graduação sem custos e de tamanha qualidade, agradeço à Universidade Federal do Paraná por tornar isto possível, e aos dois programas de pós-graduação de referência nacional que me formaram: O Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia e também à Pós-Graduação em Bioquímica, onde fiquei sediada neste tempo. Foi também graças aos recursos dos programas e auxílio de órgãos como CAPES e CNPQ que o trabalho pôde-se realizar.

Agradeço a Deus por me dar o prazer da vida e aos meus pais por me concederem a encarnação e com ela mais esta chance de plantar flores e resgatar débitos. Devo agradecer novamente aos meus pais por durante todo este tempo me proporcionarem o privilégio de exclusivamente estudar, sempre presentes me provendo e incentivando.

Depois disso agradeço a todos os professores que passaram por minha formação, desde o início, e especificamente até este momento, me acompanhando e orientando: meu orientador, professor Miguel, e coorientadoras, professoras Célia e Maria Eugênia, por me aceitarem e pela presença e ajuda em todo o decorrer deste trabalho. Não poderia deixar de agradecer ao doutorando Daniel, meu mentor em toda a parte dos experimentos biológicos, que me ensinou muito com sua experiência, paciência e dedicação. Todas essas pessoas foram, para mim, referências e inspirações a serem seguidas, me fazendo crer que não há mistérios e milagres para o sucesso além de muito trabalho e boa visão.

Por último, mas não menos importante, aos colegas e amigos dos grupos 248+E3 e LIPS/LCIN, laboratórios onde me senti em casa e tive a sorte de estar entre pessoas tão solícitas, atenciosas e inteligentes. A todas as conversas e trocas, Jacque, André, Lauri, Guilherme, Diego, Tati, Amanda, Dani, Mieko, Ester, Lu, Mari, Estela, Fran, Luisa, Gustavo, Stelée, Jenifer, Maíra, Aline, João, Israel... além dos amigos da turma de mestrado, Fer, Gi, Luis, Emerson, Denise, Cristina. Sem vocês teria sido mais difícil, se não impossível.

Grande satisfação por todos que me ajudaram, de fazer parte desses grupos e poder futuramente contribuir com este trabalho na vida das pessoas. Obrigada!

RESUMO

A falta de opções terapêuticas seguras e eficientes no cenário do melanoma traz a necessidade de que novas substâncias quimiopreventivas naturais sejam exploradas, e as microalgas são apontadas como boas candidatas de estudo. As espécies *Desmodesmus subspicatus* e *Messastrum gracile* tiveram aqui pela primeira vez seus extratos aquosos brutos e frações pré-purificadas testados contra células tumorais de melanoma (linhagem B16-F10) e parcialmente caracterizados quimicamente. Para isto, a biomassa liofilizada da microalga *D. subspicatus* (S) foi submetida a extração aquosa sequencial, a temperatura ambiente, 80 °C e 120 °C, produzindo os extratos SA, SB e SC, respectivamente. A biomassa da microalga *M. gracile* (G) foi submetida ao mesmo protocolo de extração (temperatura ambiente, 80 e 120 °C), originando os extratos GA, GB e GC, respectivamente. Os extratos obtidos a 80 °C (SB e GB) foram precipitados com etanol e dializados, gerando as frações purificadas SBP e GBP, respectivamente. Os efeitos citotóxicos dos extratos e frações purificadas contra células de melanoma B16-F10 foram avaliados por análises com vermelho neutro, cristal violeta, MTT, iodeto de propídeo e anexina + 7-AAD. Nos testes de triagem inicial foi verificada baixa citotoxicidade para os extratos e frações microalgais em baixas concentrações (10-100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), assim como a não indução de alterações no ciclo e morte celular. Análises morfológicas por MEV e microscopia confocal juntamente com avaliação de dinâmicas de migração e adesão celular revelaram efeito inibitório das frações SBP e GBP, frações estas de composição química heterogênea contendo principalmente heteropolissacarídeos. O extrato SA também foi considerado promissor pelas tendências nos testes de morfologia e migração, e sua composição revelou a presença de glicosídeos, assim como para SB, GA e GB. Estes resultados levam à conclusão de que os extratos de *D. subspicatus* e *M. gracile* podem ser considerados bons candidatos a futuros agentes terapêuticos, sendo necessários estudos aprofundados para definir seu mecanismo de inibição tumoral e caracterização química fina.

Palavras-chave: Melanoma. Microalgas. Extrato aquoso. Glicosídeos. Heteropolissacarídeos.

ABSTRACT

The lack of safe and efficient therapeutic options in the melanoma scenario brings the need for new natural chemopreventive substances to be explored, and microalgae are singled out as good candidates for study. The species *Messastrum gracile* and *Desmodesmus subspicatus* had here for the first time their crude aqueous extracts and pre-purified fractions tested against B16-F10 melanoma cells and partially chemically characterized. For this, the lyophilized biomass from microalgae *D. subspicatus* (S) was submitted to sequential aqueous extraction at room temperature, 80 °C and 120 °C, producing the extracts SA, SB and SC, respectively. The biomass of *M. gracile* microalgae (G) was submitted to the same extraction protocol (room temperature, 80 and 120 °C), yielding the extracts GA, GB and GC, respectively. The extracts obtained at 80 °C (SB and GB) were precipitated with ethanol and dialyzed, generating the purified fractions SBP and GBP, respectively. Cytotoxic effects from the extracts and purified fractions against B16-F10 melanoma cells were evaluated by neutral red, crystal violet, MTT, propidium iodide and annexin + 7-AAD. In the initial screening tests, low cytotoxicity was observed for microalgal extracts and fractions at low concentrations ($10\text{-}100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$), as well as no induction of changes in cell cycle and death. Morphological analyzes by electronic microscopy and laser confocal microscopy together with evaluation of migration and cell adhesion dynamics revealed the inhibitory effect of the SBP and GBP fractions, these fractions having heterogeneous chemical composition containing mainly heteropolysaccharides. The extract SA was also considered promising by the trends in morphology and migration tests, and its composition revealed the presence of glycosides, as well as for SB, GA and GB. These results lead to the conclusion that extracts of *D. subspicatus* and *M. gracile* can be considered as good candidates for future therapeutic agents, and in-depth studies are needed to define their mechanism of tumor inhibition and fine chemical characterization.

Key-words: Melanoma. Microalgae. Aqueous extract. Glycosides. Heteropolysaccharides.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - APARÊNCIA DO MELANOMA E REGRAS PARA DETECÇÃO	18
FIGURA 2 - MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	26
FIGURA 3 - MICROALGA <i>Messastrum gracile</i>	28
FIGURA 4 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL GERAL	36
FIGURA 5 - EXTRAÇÕES REALIZADAS NAS BIOMASSAS DE <i>D. subspicatus</i> E <i>M. gracile</i>	39
FIGURA 6 - RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES MICROALGAIS E FRAÇÕES PURIFICADAS..	50
FIGURA 7 - ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C DOS EXTRATOS MICROALGAIS	54
FIGURA 8 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS GLICOSÍDEOS PRESENTES NOS EXTRATOS MICROALGAIS: (a) SULFOQUINOVOSIL-GLICEROL, (b) DIGALACTOSIL-GLICEROL, (c) MONOGALACTOSIL-GLICEROL	56
FIGURA 9 - CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES PURIFICADAS POR HPSEC-MALLS-RID.....	57
FIGURA 10 - ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS.	59
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS PELO TESTE COM VERMELHO NEUTRO	61
FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS PELO TESTE COM CRISTAL VIOLETA	62
FIGURA 13 - EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS POR MTT.....	64
FIGURA 14 - ESTÁGIOS DO CICLO CELULAR FRENTE A AÇÃO DOS TRATAMENTOS EM 48 h.....	66
FIGURA 15 - ESTÁGIOS DO CICLO CELULAR FRENTE A AÇÃO DOS TRATAMENTOS EM 72 h.....	66
FIGURA 16 - PORCENTAGEM DE DNA FRAGMENTADO FRENTE A AÇÃO DOS TRATAMENTOS	66
FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR SEGUNDO AÇÃO DOS TRATAMENTOS	67
FIGURA 18 - PADRÃO MORFOLÓGICO DO CULTIVO CELULAR FRENTE A ATIVIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS (MEV)	69

FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER E MARCAÇÃO DAPI+FALOIDINA.....	71
FIGURA 20 - EFEITO DOS TRATAMENTOS MICROALGAIS NA ADESÃO CELULAR.....	73
FIGURA 21 - EFEITO DO TRATAMENTO GA SOBRE A ADESÃO CELULAR	73
FIGURA 22 - FOTOS OBTIDAS NO EXPERIMENTO DE MIGRAÇÃO CELULAR...	74
FIGURA 23 - EFEITO DOS TRATAMENTOS MICROALGAIS NA MIGRAÇÃO CELULAR.....	75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DO MEIO CHU UTILIZADO PARA OS CULTIVOS DAS MICROALGAS <i>D. subspicatus</i> e <i>M. gracile</i>	37
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CELULAR DMEM.....	43
TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E PERCENTUAIS DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS TOTAIS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS.	52
TABELA 4 - ASSINALAMENTOS DOS ESPECTROS DE RMN RELATIVOS ÀS MOLÉCULAS DE GLICOSÍDEOS PRESENTES NOS EXTRATOS GA E SA OBTIDOS SOB TEMPERATURA AMBIENTE	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA - Albumina Sérica Bovina

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

FBR – Fotobiorreator

GIA - Grupo de Pesquisa Integrado de Aquicultura

HPSEC - *High Pressure Size Exclusion Chromatography*

HPSEC-MALLS-RID - Cromatografia de exclusão estérica de alta performance acoplada a detector de índice de refração e espalhamento de luz

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

TGA - *Thermo Gravimetric Analysis*

Vvm - Volume de ar por Volume de meio, por Minuto

SA - Extrato de *D. subspicatus* obtido em temperatura ambiente

GA - Extrato de *M. gracile* obtido em temperatura ambiente

SB - Extrato de *D. subspicatus* obtido em 80 °C

GB - Extrato de *M. gracile* obtido em 80 °C

SC - Extrato de *D. subspicatus* obtido em 120 °C

GC - Extrato de *M. gracile* obtido em 120 °

SBP - Fração purificada a partir do extrato de *D. subspicatus* obtido em 80 °C

GBP - Fração purificada a partir do extrato de *M. gracile* obtido em 80 °C

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1	CÂNCER: CONCEITOS E ESTATÍSTICAS.....	15
1.1.1	Melanoma.....	17
1.1.2	Substâncias antitumorais.....	21
1.2	MICROALGAS.....	23
1.2.1	Espécies utilizadas.....	26
1.2.2	Microalgas como fábricas de compostos bioativos.....	29
1.2.3	Compostos microalgais com ação antitumoral.....	31
2	JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	36
3.2	CULTIVO DAS MICROALGAS	36
3.3	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS	38
3.4	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DOS EXTRATOS E FRAÇÕES..	39
3.4.1	Determinação de proteínas e carboidratos totais	39
3.4.2	Composição monossacarídica por cromatografia gasosa (CG).....	40
3.4.3	Deslocamentos químicos por ressonância magnética nuclear (RMN).....	41
3.4.4	Perfil de eluição por cromatografia de exclusão (HPSEC-MALLS-RID)	41
3.4.5	Perfil de degradação por termogravimetria (TGA)	42
3.5	CULTIVO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	42
3.6	AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS	43
3.6.1	Ensaio de viabilidade celular por vermelho neutro	44
3.6.2	Ensaio de proliferação celular por cristal violeta.....	44
3.6.3	Ensaio de viabilidade celular por MTT	44
3.7	ANÁLISES DE CICLO E MORTE CELULAR.....	45
3.7.1	Deteccção de estágios do ciclo celular por iodeto de propídeo	45
3.7.2	Deteccção de morte celular por Anexina-V e 7-AAD	46
3.8	ENSAIOS MORFOLÓGICOS	47
3.8.1	Morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	47
3.8.2	Análise de núcleo e citoesqueleto por microscopia confocal a laser	47
3.9	MEDIÇÕES DE DINÂMICAS CELULARES EM CULTIVO.....	48

3.9.1	Ensaio de adesão a matrizes extracelulares	48
3.9.2	Ensaio de migração (<i>Scratching</i>)	49
3.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES E PURIFICAÇÕES	50
4.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DOS EXTRATOS E FRAÇÕES..	51
4.2.1	Determinação de proteínas e carboidratos totais	51
4.2.2	Composição monossacarídica por cromatografia gasosa (CG).....	51
4.2.3	Análise dos sinais químicos (RMN)	53
4.2.4	Perfil de eluição por cromatografia de exclusão (HPSEC-MALLS-RID)	56
4.2.5	Perfil de degradação por termogravimetria (TGA)	57
4.3	AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE, DENSIDADE E TOXICIDADE CELULAR DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS	60
4.3.1	Viabilidade celular por vermelho neutro	60
4.3.2	Densidade celular por cristal violeta	60
4.3.3	Citotoxicidade por MTT	63
4.4	ANÁLISES DE CICLO E MORTE CELULAR.....	65
4.4.1	Detecção de estágios do ciclo celular por iodeto de propídeo	65
4.4.2	Detecção de morte celular por anexina e 7-AAD	67
4.5	ENSAIOS MORFOLÓGICOS	68
4.5.1	Morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	68
4.5.2	Análise de núcleo e citoesqueleto por microscopia confocal a laser	70
4.6	MEDIÇÕES DE DINÂMICAS CELULARES EM CULTIVO	73
4.6.1	Ensaio de adesão a matrizes extracelulares	73
4.6.2	Ensaio de Migração (<i>Scratching</i>)	74
5	CONCLUSÕES	77
6	PERSPECTIVAS E SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CÂNCER: CONCEITOS E ESTATÍSTICAS

A palavra câncer vem do grego *karkínos*, que quer dizer caranguejo. Atualmente já são descritos mais de cem tipos de câncer, diferenciados pela etiologia, processo de evolução e forma de tratamento, por isso o câncer não é considerado uma patologia única. Calcula-se que o número de pessoas que estejam convivendo com a doença seja de 32,6 milhões, e as estatísticas de projeção futura são alarmantes: espera-se um aumento de 70% nas próximas duas décadas (BBC, 2016). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 600 mil novos portadores de câncer para 2018 no Brasil (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2011).

A Organização Mundial da Saúde (OMS ou WHO – *World Health Organization*) aponta que 8,8 milhões de pessoas ao redor do mundo faleceram por câncer em 2015, doença que gera um custo anual de cerca de 1 trilhão de dólares, sendo que de 30-50% dos casos poderiam ser evitados. Também segundo a OMS, cerca de 1/3 dos casos estão ligados a fatores comportamentais, como excesso de peso, dieta pobre em frutas e vegetais, falta de atividade física e uso de álcool e tabaco (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A célula cancerosa caracteriza-se pela perda de função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação descontrolada e invasividade dos tecidos adjacentes. Essa perda de funções deriva do acúmulo de mutações indesejadas no material genético, causando erros que não são revertidos pela maquinaria de reparo celular, sendo por isso considerada uma doença do DNA. No crescimento celular não controlado, tem-se uma massa anormal de tecido, com crescimento quase autônomo, assim persistindo até mesmo após o término de estímulos, denominando-se neoplasias ou tumores (CASSIDY; BISSETT; OBE, 2002).

A neoplasia benigna (ou carcinoma *in situ*) é o primeiro estágio de classificação das neoplasias (não se aplica a cânceres do sistema sanguíneo), no qual há um crescimento celular organizado, geralmente lento. Apesar de esses tumores apresentarem limites definidos e não serem invasivos, podem ainda sim comprimir órgãos e tecidos adjacentes. São exemplos o lipoma (origina-se no tecido adiposo), o mioma (que tem origem no tecido muscular liso) e o adenoma (tumor benigno das glândulas). Nesse estágio, por as células cancerosas permanecerem

somente na camada tecidual de origem, a neoplasia geralmente pode ser contida (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2011).

No carcinoma invasivo (neoplasia ou tumor maligno), as células cancerosas apresentam crescimento rápido, desorganização e perda de diferenciação, sendo capazes de adentrar a corrente sanguínea ou linfática e se disseminarem à outras partes do corpo. Esse processo de invasão e disseminação das células de um foco tumoral (primário) para outros tecidos é chamado metástase. Como exemplos de tumores invasivos tem-se o glioma (origem nas células da glia), o linfoma (origem nos linfócitos) e o melanoma (origem nos melanócitos). A capacidade metastática configura-se como característica mais crítica do câncer, e é também o que gera dificuldade de ação dos tratamentos (WEINBERG, 2008).

Dentro do núcleo celular, independentemente da exposição a agentes cancerígenos, o DNA naturalmente sofre processos de mutação genica. Porém, quando as mutações recaem sobre alguns genes específicos, pode-se iniciar o desenvolvimento de um câncer. São três os grupos gênicos mais críticos relacionados: 1) os proto-oncogenes, que estimulam as células a proliferação; 2) os genes supressores de tumor, que “barram” o crescimento celular; 3) e a terceira classe corresponde aos genes de manutenção e reparo do DNA.

O processo de desenvolvimento do câncer chama-se oncogênese ou carcinogênese, e é composto por três estágios:

- I) Iniciação, no qual ocorrem as mutações gênicas;
- II) Promoção, no qual os agentes cancerígenos mantêm os estímulos sobre a célula já alterada; e
- III) Progressão, caracterizada pela multiplicação descontrolada e irreversível da célula. Os estágios da carcinogênese influenciam diretamente o prognóstico e a forma de tratamento (WEINBERG, 2008).

A terapêutica do câncer baseia-se, de forma geral, na remoção cirúrgica dos tumores aliada ao tratamento radioterápico, quimioterápico e/ou imunoterápico. Recentemente o emprego de anticorpos monoclonais, unidos a medicamentos ajudavantes e protocolos pós-cirúrgicos vem melhorando os resultados do tratamento de alguns tipos de cânceres. Infelizmente, muitos tumores ainda apresentam respostas modestas aos protocolos clínicos, o que somado aos efeitos colaterais dos tratamentos empregados torna grande a necessidade do

desenvolvimento de modalidades terapêuticas mais eficientes (FERREIRA; ROCHA, 2004).

Nesse contexto da busca por novas terapias, um fator interessante é que o Brasil é considerado o país com maior biodiversidade do mundo, contando com 20% do número total de espécies do planeta (KATO, 2001), sendo muitas dessas espécies endêmicas. As pesquisas científicas e tecnológicas são instrumentos essenciais para o desenvolvimento sustentável de um ecossistema tão diversificado, além de trazer benefícios econômicos e sociais diretos pelo avanço de descobertas medicinais e outros produtos de uso industrial (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

O câncer de pele corresponde a 33% de todos os cânceres no Brasil, sendo registrados pelo INCA, a cada ano, em torno de 180 mil novos casos. Existem 3 tipos desse câncer: a) o carcinoma basocelular; b) o carcinoma de células escamosas ou espinocelular; e c) o melanoma. O conjunto dos dois primeiros é conhecido como "cancros de pele não melanoma", que são os tipos mais comuns e de baixa letalidade, porém alta incidência; taxas que se invertem quando se trata do melanoma, que é o mais raro e agressivo dos cânceres de pele. A maioria dos casos de câncer de pele são causados por exposição demasiada à radiação solar ultravioleta (UV), esta que tende a aumentar, devido à destruição da camada de ozônio atmosférica, incrementando o risco de todos esses tipos de câncer (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA – (SBD) 2017).

1.1.1 Melanoma

O melanoma consiste em uma neoplasia maligna na pele, em células denominadas melanócitos. Apesar de no Brasil ser um câncer com baixa incidência, representando 3% das neoplasias malignas de pele, apresenta alta capacidade metastática e por isso alta letalidade se descoberto tardiamente, sendo importante o diagnóstico precoce. Em 2013 o INCA registrou 1.547 mortes decorridas do melanoma no Brasil, sendo 903 homens e 644 mulheres. Para 2018 a estimativa de novos casos é de mais 6260 pessoas com a doença (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) 2018).

O registro mais antigo de melanoma foi a 2.400 anos atrás, em uma múmia, no Peru (REBECCA; SONDAK; SMALLEY, 2012). No passado a melanina era vista como uma espécie de "sujeira" biológica, isto porque não se compreendia sua

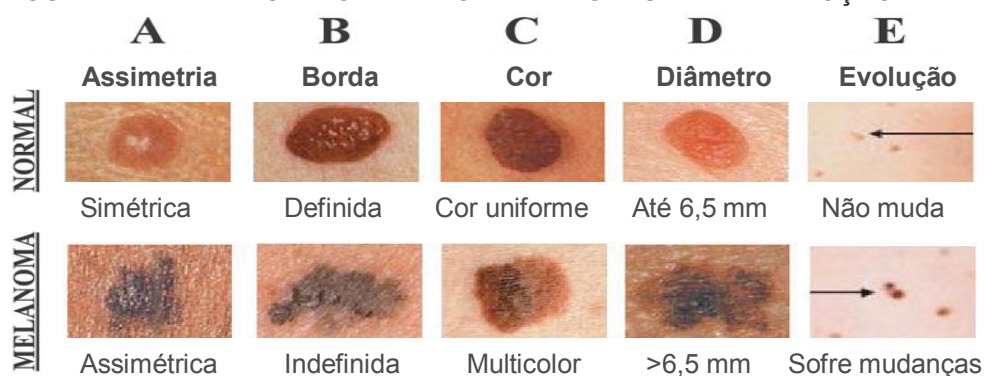
função, tampouco por que estava relacionada a regiões de baixa latitude (TOLEDO, 2012a). O melanoma foi também relatado em outras espécies, como cães, cavalos, porcos, pássaros e peixes (WILLIAMS et al., 2011; SWEET et al., 2012).

Na década de 1920, Coco Chanel, uma estilista francesa, popularizou a pele bronzeada como glamourosa e de alto status social. Ainda hoje o uso de câmaras de bronzeamento continua, apesar de evidências científicas de que seu uso aumenta o risco de desenvolver melanoma (LAZOVICH et al., 2010). Na cultura asiática, em geral as pessoas procuram evitar a exposição solar, sendo a pele pálida a preferida, o que se comprova na alta demanda por dermocosméticos clareadores (QUAH et al., 2014).

Os fatores de risco deste câncer incluem pele e olhos claros, cabelos ruivos, incapacidade de bronzeamento, exposição à luz solar intensa, queimaduras solares durante a infância e histórico familiar de melanoma (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Se tratado precocemente, o melanoma apresenta alta porcentagem de cura, no entanto para pacientes com a doença já em estágio avançado a taxa de sucesso terapêutico, mesmo com as novas imunoterapias, é de 15 a 20% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018).

O diagnóstico do melanoma é feito por médico dermatologista, pela análise visual e possível biópsia das manchas ou pintas corporais (FIGURA 1). Pintas escuras, irregulares, assimétricas, acompanhadas de coceira ou descamação são características do melanoma; em contraste com pintas de cor, tamanho e forma definida, que não costumam mudar seu aspecto, atribuídas como não malignas (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD), 2017).

FIGURA 1 - APARÊNCIA DO MELANOMA E REGRAS PARA DETECÇÃO



NOTA: Características de manchas normais e neoplásicas. FONTE: Adaptada de DYERSBURG SKIN AND ALLERGY CLINIC (2018).

Na FIGURA 1 podem ser observadas manchas corporais escurecidas, refletindo a pigmentação chamada melanina. A melanina é o principal pigmento responsável por colorir a pele e pelos dos mamíferos, sendo que sua ausência configura-se em uma condição chamada albinismo. Esse pigmento é produzido pelos melanócitos em organelas especializadas (melanossomos) e distribuído aos queratinócitos circundantes, acumulando próximo aos núcleos celulares a fim de evitar que a luz UV provoque danos ao DNA (MEYLE; GULDBERG, 2009).

Os melanócitos, células relacionadas ao melanoma, localizam-se na epiderme, próximos à camada basal. Essas células interagem intimamente com outras chamadas queratinócitos, estes que, sob a ação dos UV na pele, liberam fatores de crescimento, controlando os processos de sobrevivência, proliferação, diferenciação, motilidade e melanogênese nos melanócitos. Os queratinócitos também podem inibir a proliferação dos melanócitos, e acredita-se que essa inibição dependa do contato célula-célula, mediado por proteínas de membrana E-caderinas (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

O desenvolvimento do melanoma é um processo complexo de múltiplos estágios, incluindo um sistema de iniciação-promoção-progressão mediado por diversas alterações celulares, bioquímicas e moleculares. A biossíntese da melanina – melanogênese – envolve uma via metabólica que inicia com a oxidação da tirosina em dopaquinona pela enzima tirosinase, seguida por uma série de etapas que dão origem a um pigmento predominantemente indólico, a eumelanina; e a um pigmento com subunidades de benzotiazina, a feomelanina; constituindo assim as duas classes de melanina (LEHNINGER; NELSON, 2006).

Quando a melanogênese tem sua regulação muito elevada, com sobre-expressão de tirosinase nos melanócitos, se estabelece um processo defeituoso, podendo resultar em vazamento de moléculas precursoras e enzimas dos melanossomos. A detecção de tirosinase no sangue é utilizada como marcador diagnóstico de melanoma, e os testes para a presença de melanógenos no sangue e urina são ensaios clínicos de monitoramento (ROCHA et al., 2009).

Além da melanogênese, outras vias metabólicas interferem na formação de melanomas, como a ativação da via MAPK. Esta via transforma parcialmente os melanócitos, posteriormente alterações adicionais são necessárias para a transformação maligna total, como a ativação da telomerase e mutações que afetam o *checkpoint* G1/S do ciclo celular. Dois genes que também influenciam diretamente

na diferenciação de melanócitos para melanomas são o KIT (CD117) e o fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) (YAJIMA et al., 2011; LAU et al., 2015). A radiação UV é o fator mutagênico predominante atuando durante todos os estágios da evolução do melanoma até sua transição para a forma invasiva (HUNTER; BASTIAN, 2016).

O conhecimento acerca dos marcadores moleculares envolvidos no desenvolvimento de metástases no melanoma é fundamental para a identificação de indivíduos geneticamente predispostos, auxiliando na detecção precoce da neoplasia e possibilitando melhor prognóstico (POLSKY et al., 2001). Esses fatores se associam principalmente a mutações nos genes de ciclinas (CD1, CDK4), no gene do receptor de melanina MC1R e proteínas inibidoras do complexo CDK/ciclinas, como p16, p19, pRb e p53. Esses fatores trabalham em conjunto regulando a proliferação e morte celular, assim impedindo o descontrole do ciclo, gerando as neoplasias (PHO; GROSSMAN; LEACHMAN, 2006; MOTOKAWA et al., 2007).

Os dois tipos mais comuns de melanoma são o melanoma CSD (cronicamente danificado pelo sol) e o melanoma não-CSD. A mutação inicial mais comum em melanomas não-CSD é a BRAF V600E, que na ausência de outras mutações, resulta numa expansão limitada dos melanócitos para formar um nevo comum. Esses nevos são lesões estáveis compostas por uma junção de células senescentes e células em proliferação lenta que são compensadas pelo sistema imune, raramente progredindo para o melanoma. Porém acredita-se os melanomas CSD não se originem de nevos comuns, mas sim de lesões de melanoma *in situ*, possuindo um conjunto diferente de mutações condutoras, como NRAS, NF1 além de BRAF nonV600E (HUNTER; BASTIAN, 2016).

O tratamento do melanoma é cirúrgico. Retira-se o tumor e, dependendo do estágio da doença, alia-se quimioterapia, radioterapia e/ou imunoterapia. Devido ao prognóstico desfavorável do melanoma, métodos acurados de diagnóstico devem ser utilizados, juntamente com a pesquisa e desenvolvimento de novas fontes terapêuticas e adjuvantes (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD), 2017).

Alguns estudos avaliaram o uso de dietas específicas para o tratamento de pacientes com melanoma. Foram relatados resultados interessantes de um aumento de seis vezes nas taxas de sobrevida de pacientes com melanoma tratados com a

dieta Gerson (baixo sódio, alto potássio, dieta lactovegetariana que enfatiza vegetais frescos, sucos de frutas e suplementos vitamínicos) (HILDENBRAND et al., 1995). O consumo de carotenóides também tem sido associado à redução do risco de melanoma (MILLEN et al., 2004), tal como os prebióticos, que surgiram recentemente como uma importante defesa contra cânceres. Em um estudo foi descoberto que ratos com populações gastrointestinais de *Bifidobacterium longum* obtinham o mesmo controle de tumores que os ratos administrados com a terapia PD-L1 ("*Protein cell Death Ligant 1*"), que consiste no uso de anticorpos que se ligam e bloqueiam a proteína apoptótica PD-1, tendo a combinação da terapia com o probiótico abolido quase a totalidade do tumor (SIVAN et al., 2015). Wang et al., (2006) já haviam relatado que a suplementação do polissacarídeo alginato a 2,5% como prebiótico em ratos aumentou 13 vezes a população de *Bifidobacterium* em comparação ao grupo controle; sendo possível traçar, entre estes trabalhos, a correlação entre probióticos, prebióticos e câncer (TEAS; IRHIMEH, 2017).

Embora exista cerca de 500 estudos relacionados a algas e câncer, apenas alguns focam em melanoma, combinando 18 resultados para algas e melanoma (PUBMED, 2018). Os mais conhecidos dos compostos algais anti-tumorais são as fucoidanas (polissacarídeos de algas marrons), com vários estudos mostrando inibição do melanoma *in vitro* e *in vivo* (KOYANAGI et al., 2003; ALE et al., 2011a; ALE et al., 2011b; CROCI et al., 2011; VISHCHUK et al., 2012; JIN et al., 2014; ANISIMOVA et al., 2015). Outro polissacarídeo de *Ascophyllum sp.* denominado ascofilana (heteropolissacarídeo sulfatado composto por fucose, ácido urônico e xilose em iguais proporções) também obteve atividade imunoestimulante contra o melanoma, inibindo a invasão e migração tumoral *in vitro* e formação de metástases pulmonares *in vivo* (ABU et al., 2015).

Além das estratégias de prevenção e contenção tumoral relacionadas a dietas, alimentos funcionais, prebióticos e probióticos, há que se estudar também substâncias antitumorais – moléculas naturais ou sintéticas – a serem aplicadas nos pacientes a fim de melhor combater o câncer.

1.1.2 Substâncias antitumorais

O século XX apresentou um grande avanço na pesquisa oncológica de produtos naturais, oriundos de plantas e micro-organismos, culminando na

descoberta de diversas substâncias utilizadas atualmente na terapia antitumoral. A maioria dos fármacos anticâncer introduzidos clinicamente nas últimas décadas tem origem nos produtos naturais, destacando-se dentre eles a vimblastina (Velban®) e vincristina (Oncovin®), o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®), a camptotecina e seus análogos (Hycamtin®, Camptosar®), medicamentos que movimentam anualmente um mercado de cerca de 60 bilhões de dólares. A descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e reduzidos efeitos colaterais é a principal meta de pesquisadores (PINTO; HELENA; SILVA, 2002; COSTA-LOTUFO et al., 2010).

De maneira geral, substâncias naturais de estrutura química complexa acabam inviabilizando sua obtenção sintética, sendo necessário o isolamento de fonte natural. É o caso do Taxol®, uma substância de comprovada ação antitumoral sobre o melanoma B16-F10, isolado inicialmente de *Taxus brevifolia*, entretanto com baixo rendimento (0,00003 a 0,069%), dificultando sua aplicabilidade clínica. No entanto, muitas vezes a presença de substâncias de classes diferentes ou da mesma classe, com pequenas variações estruturais, contribuem sinergicamente para a mesma resposta biológica, desta forma, um extrato pode apresentar determinada ação e seus componentes isolados serem menos ativos ou inativos. O isolamento de compostos presentes em plantas e algas e a descoberta de suas atividades biológicas, bem como seus mecanismos de ação, segue sendo um desafio, mas também um valioso serviço à ciência e à sociedade (MACIEL et al., 2013).

As substâncias antitumorais empregadas atualmente podem ser classificados em dois grupos: o primeiro constituído por inibidores da iniciação do processo carcinogênico, e o segundo por drogas inibidoras da proliferação celular durante as fases de promoção e progressão. Muitos agentes do primeiro grupo são encontrados em alimentos, como os diterpenos do café, os ácidos sulfídicos do alho (DUVOIX et al., 2005) e os polifenóis do chá verde (LAMBERT et al., 2005).

Os agentes supressores são os mais procurados para o desenvolvimento de novos fármacos, atuando após a instalação da neoplasia (DUVOIX et al., 2005). Porém, devido aos mecanismos de ação dessas drogas, que inibem o crescimento ou matam as células malignas, essas acabam por gerar danos ao DNA de células adjacentes, levando à formação de outras células neoplásicas (SUBHASHINI; MAHIPAL; REDDANNA, 2005). Recentemente já foram identificados fármacos com

atividade específica apenas contra alguns mecanismos metabólicos das células tumorais, como a neovascularização, migração e capacidade de metastização, agindo assim com maior foco na contenção do tumor (COSTA-LOTUFO et al., 2010b).

Apesar da comprovada viabilização medicinal de substâncias bioativas de espécies vegetais, estimou-se que são necessários 12 anos de estudo com uma determinada substância até sua comercialização ser aprovada pelo FDA, o que representa um custo de US\$ 231 milhões aplicados em pesquisas (VAGELOS, 1991). Outra estimativa aponta que, para cada 10 mil substâncias sintetizadas e avaliadas em experimentos farmacológicos *in vitro*, apenas 20 serão testadas *in vivo* e metade destas em ensaios clínicos em humanos, sendo que deste montante apenas uma recebe a aprovação do FDA. Contudo, as microalgas já são apontadas e estabelecidas como candidatas promissoras de pesquisas científicas e aplicações médicas e industriais (VANGELOS, 1991; MACIEL et al., 2013).

1.2 MICROALGAS

As algas são organismos fotossintéticos que convertem a energia luminosa do sol em energia química no processo de fotossíntese (SHANAB et al., 2012). São os organismos fotossintéticos mais antigos do planeta, existindo a cerca de 3,8 bilhões de anos. A biomassa algal contém compostos com diversas estruturas e funções, sintetizados em resposta a condições de estresse como forma de proteção. Esse grupo de organismos é considerado fundamental para a manutenção da vida na Terra, uma vez que participam da produção de maior parte do O₂ da atmosfera (CHOJNACKA; KIM, 2015).

As microalgas são organismos unicelulares encontrados em corpos aquáticos em todo o globo terrestre, podendo ainda estar presentes em folhas ou caules de vegetais além de formar líquens (simbiose com fungos). Colonizam desde ambientes de água doce até zonas polares e lagos extremamente salinos. Em sua maioria apresentam uma forma de vida planctônica, vivendo em suspensão nas zonas fóticas, mas também podem apresentar forma de vida bentônica, em maiores profundidades, junto a zonas costeiras (BARSANTI; GUALTIERI, 2014).

Os relatos da utilização de microalgas na alimentação humana datam de 2000 anos atrás, com a utilização de *Nostoc*, *Spirulina* e *Aphanizomenon* por

chineses e indígenas. A partir de 1950 o conhecimento de sua rica composição química abriu outros campos para utilização de sua biomassa e extratos, principalmente para aquicultura e indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos. (SPOLAORE et al., 2006).

Estão atualmente descritas cerca de 40 mil espécies de microalgas (BARSANTI; GUALTIERI, 2014). As microalgas existem tanto como seres procarióticos (cianobactérias ou algas azuis-esverdeadas) e eucarióticos, pertencendo às classes Bacillariophyceae (diatomáceas), Dinophyceae (dinoflagelados), Prymnesiophyceae (cocolitoforídeos), Cryptophyceae (criptomônadas), Prasinophyceae e Chlorophyceae (microalgas verdes) (BICUDO; MENEZES, 2006; DEMIRBAS, 2010).

As condições para o cultivo de microalgas são fatores importantes que influenciam o metabolismo, direcionando-o para a síntese de compostos de interesse. Diversos pesquisadores observaram a influência de parâmetros como temperatura de incubação, pH e composição do meio de cultivo, salinidade, intensidade de luz e fotoperíodo. A limitação na fonte de nitrogênio, por exemplo, pode levar microalgas a direcionar o metabolismo à produção de lipídios ou carboidratos (MORAIS et al., 2015).

Os extratos algais possuem um amplo espectro de aplicações, apesar de sua composição variável, devido a flutuações na matéria-prima e diferentes técnicas de extração (ALVES; SOUSA; REIS, 2013), tais como: a) extração aquosa; b) com solventes orgânicos; ou c) enzimática. Na escolha da técnica de extração é necessário selecionar o composto alvo, as espécies de algas que o contenham e as condições de operação para encontrar uma boa razão entre rendimento e pureza.

A extração de compostos da biomassa algal não é seletiva, sendo o extrato bruto uma mistura de substâncias. Alguns fatores como a espécie da alga, condições ambientais do *habitat* natural, estação da colheita, idade do cultivo, localização geográfica e tecnologias de processamento influenciam a composição e consequentemente a atividade dos extratos (BALBOA et al., 2013). Por exemplo, o etanol é mais eficiente na extração de polifenóis que a água (FARVIN; JACOBSEN, 2013), enquanto na extração de polissacarídeos de *Spirulina* sp., em estudo conduzido por Chaiklahan et al. (2013), foi verificado que as condições de operação mais significativas eram temperatura, razão sólido-líquido e tempo de extração.

Muitas vantagens podem ser citadas quanto ao investimento em cultivo e produção de microalgas. A começar de suas exigências nutricionais, que não são elevadas, com rápido crescimento na presença de luz, viabilizando sua produção em tanques abertos e com água de seu ambiente natural. Possuem alta diversidade taxonômica e de composição química, somadas a possibilidade de cultivo em biorreatores com crescimento controlado, produzindo uma gama de metabólitos, despertando o interesse por aplicações biotecnológicas. Além disso, outros aspectos importantes relacionados às microalgas são o uso de energia solar e dióxido de carbono (CO₂), contribuindo para a redução do efeito estufa e crescendo em rendimentos mais altos que as plantas superiores (OLIVEIRA, 2008).

Os benefícios das microalgas se estendem ao setor ambiental, com sua aplicação no tratamento de águas residuais, devido a capacidade de biorremediar (retirar do meio) íons metálicos (biolixiviação) e compostos orgânicos. Além disso, também podem ser utilizadas como biosensores monitorando a qualidade de sistemas aquáticos ou em testes ecotoxicológicos (CRISTINA; ROLLEMBERG, 2004; BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008).

Ademais, as microalgas podem ser cultivadas em áreas e climas inadequados para a agricultura, sem competir com terras de produção agrícola, tudo isso com auxílio dos fotobiorreatores (FBR) (MICHALAK; CHOJNACKA, 2015). Os FBR são versáteis, podendo ser construídos com tubos ou placas, de materiais como plástico, vidro ou policarbonato, permitindo um maior controle das condições de cultivo, maior troca de gases, menor contaminação e área ocupada em relação aos sistemas abertos (LEE; PALSSON, 1995; COGNE; CORNET; GROS, 2005; SUALI; SARBATLY, 2012; JANOSKA et al., 2017). Essas vantagens permitem alcançar uma maior produtividade de biomassa em comparação aos sistemas abertos, potencializando o acúmulo de produtos de interesse comercial (CHEN et al., 2008; ISSARAPAYUP; POWTONGSOOK; PAVASANT, 2009).

Esses produtos de interesse, além de possuírem utilização em diversas áreas como biocombustíveis, aditivos e estabilizantes alimentícios, já demonstraram variadas atividades biológicas: antimicrobiana, antiviral, anticoagulante, antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; CARVALHO et al., 2013; MORAIS et al., 2015). Estima-se que ainda 97% de todos os compostos marinhos existentes permaneçam inexplorados (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011a), reforçando o motivo das microalgas, tanto marinhas como dulciaquícolas,

serem um relevante alvo de pesquisa acadêmica e tecnológica (SHIGEAKI et al., 1988; GEDOUIN; VALLEE, 2001; STANLEY et al., 2003; ELSOHLY et al., 2007a; ELSOHLY et al., 2007b; PASCO; PUGH, 2010; HUANG, 2011; SUAREZ et al., 2011; DILLON et al., 2012). A seguir serão apresentadas as espécies utilizadas no presente trabalho.

1.2.1 Espécies utilizadas

1.2.1.1 *Desmodesmus subspicatus*

Do filo Chlorophyta (algas verdes) e classe Chlorophyceae, a família Scenedesmaceae contém 60 gêneros, dentre eles o gênero *Desmodesmus* (ALGAE BASE, 2018a). Em 1829 Meyen descreveu o gênero *Scenedesmus*, que foi dividido em quatro subgêneros (CHODAT, 1926). Hegewald, (1978), baseado nas características da parede celular, apresentou uma nova subdivisão para o gênero *Scenedesmus*, e por fim, no ano 2000, Hegewald, reclassificou o gênero *Desmodesmus* com base em características morfológicas e técnicas de biologia molecular.

A espécie *Desmodesmus subspicatus* (FIGURA 2) é predominante em rios, pode ter forma elipsoide ou ovoide, medindo de 4,8 a 12 μm de comprimento, clorofilada, de reprodução majoritariamente assexuada. Sua parede celular contém espinhos, e é composta por hemicelulose e 4 camadas de esporopolenina – um mix de ácidos graxos, fenóis, carotenoides e polímeros advindos de fenilalanina (SHUBERT; WILK-WOŹNIAK; LIGEŻA, 2014).

FIGURA 2 - MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*



FONTE: Algaebase (2018b).

Essa espécie apresenta os carotenoides neoxantina, lodoxantina, violaxantina, luteína, β -caroteno. É principalmente utilizada para alimentação e aquicultura. Outras pesquisas destacam o potencial das microalgas *Desmodesmus sp.* e *Scenedesmus sp.* no tratamento de efluentes (JI et al., 2014; SCHERER et al., 2017).

Algumas atividades biológicas já foram descritas para *D. subspicatus*. Em nosso grupo de pesquisa foi demonstrada atividade bioestimulante vegetal do extrato aquoso da microalga *D. subspicatus*, resultando em um depósito de patente (MÓGOR et al., 2011). Seu extrato aquoso mostrou também atividade antibacteriana, frente a cepas de *Staphylococcus sp.* para extratos em concentrações acima de 6 mg.mL^{-1} (CARDOSO et al., 2013).

Os extratos orgânicos também foram investigados e demonstraram potenciais atividades antitumoral e quimiopreventiva, modulando ação de enzimas envolvidas na tumorigênese (QR, GST, GSH, CYP), quando a alga foi cultivada em meio residual a base de urina suína (CARDOSO et al., 2013). Esses extratos também mostraram-se citotóxicos à linhagem tumoral L5178Y-R *in vitro* pelo mecanismo de apoptose, não afetando linfócitos normais (REYNA-MARTINEZ et al., 2018). O extrato etanólico revelou atividade antioxidante, pela capacidade de capturar os radicais DPPH ($\text{IC}_{50} = 3.03 \text{ mg.mL}^{-1}$) e ABTS ($\text{IC}_{50} = 2.41 \text{ mg.mL}^{-1}$), mostrando também atividade quelante para o ferro ($\text{IC}_{50} = 1.10 \text{ mg.mL}^{-1}$) e para o cobre ($\text{IC}_{50} = 3.66 \text{ mg.mL}^{-1}$) (GAGO, 2016).

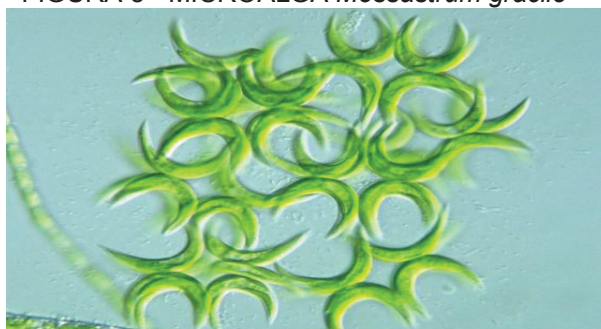
Quanto a estudos de composição química, Mazepa (2013) identificou glicosídeos no extrato aquoso obtido em temperatura ambiente de *D. subspicatus* e suas subfrações. Posteriormente foram identificados e quantificados por HPLC-MS alguns fitohormônios em frações do mesmo extrato por estudos realizados por Malburg (2016) e Oliveira (2017). A composição química do extrato etanólico foi analisada por HPLC e GC-MS, através da qual foi possível identificar os compostos neofitadieno, fitol, ácido α -linolénico, ácido palmítico, ácido araquidónico e ácido palmitelaídico, demonstrando potencial atividade no tratamento de diabetes (GAGO, 2016).

No extrato lipídico da microalga *Scenedesmus obliquus* os ácidos graxos encontrados foram oléico (32%), palmítico (29,5%) e esteárico (12%), e estes apresentaram ação de inibição à proliferação de linhagens tumorais (MCF-7, HepG2 e HCT-116 (ABD EL BAKY; EL-BAROTY; IBRAHIM, 2014).

1.2.1.2 *Messastrum gracile*

A microalga *Messastrum gracile* (FIGURA 3) (SILVA et al., 2017), antes descrita como *Ankistrodesmus gracilis* (KORSHIKOV, 1953) e primeiramente como *Selenastrum gracile* (REINSCH, 1866), também é uma espécie dulciaquícula, colonial, de reprodução assexuada, clorofilada, pertencente ao filo Chlorophyta (algas verdes) e classe Chlorophyceae, porém da família Selenastraceae, gênero *Messastrum* e espécie *M. gracile* (ALGAE BASE, 2017).

FIGURA 3 - MICROALGA *Messastrum gracile*



FONTE: PROTIST INFORMATION SERVER, 2018.

Na literatura encontram-se poucos estudos com esta espécie – nenhum resultado para *Messastrum gracile*, 12 para *Ankistrodesmus gracilis* e 6 para *Selenastrum gracile* (PUDMED, 2018). As vantagens dessa alga, que a tornaram foco no presente estudo são a possibilidade de cultivo em meio formulado com efluentes ou subprodutos (FIORESI; TAVARES, 2008) e também a possibilidade de cultivo em FBR (NOSEDA et al., 2016), além de já ter demonstrado atividade citotóxica contra células tumorais (HOA et al., 2011) e ter-se estudado seu exopolissacarídeo (MECCHERI, 2016).

Resultados da composição química do exopolissacarídeo de *Messastrum gracile* revelaram manose e glucose como os monossacarídeos principais, e a análise de metilação mostrou como ligações glicosídicas predominantes 1→2-manose, seguida por T-glucose e 1→4-glucose. Na análise de infravermelho a proporção de pontos de ramificação foi maior do que a presença de pontos terminais, indicando a presença de éster sulfato na composição do carboidrato, com picos correlacionando a presença de S=O e grupo éster-sulfato (C-O-S) no carbono secundário na posição equatorial do anel, além de picos característicos de grupos carboxílicos, indicando um polissacarídeo ácido (MECCHERI, 2016).

A citotoxicidade do extrato orgânico (clorofórmio:metanol) de *M. gracile* foi avaliada, em um estudo no qual outras 14 cepas microalgais foram analisadas por MTT. *M. gracile* VACC-010 e *Amphiprora alata* VACC-007 demonstraram as maiores inibições (26,5 e 29,8 µg/mL, respectivamente) contra células KB, sendo então selecionadas para testes contra as linhagens tumorais HepG2, SK-LU-1 e MCF7; onde apenas o extrato de *M. gracile* causou inibição, com a maior atividade contra a linhagem de câncer hepático (HepG2) na concentração de 9,64 µg.mL⁻¹. Os resultados evidenciam que a alga *M. gracile* contém compostos que exercem atividade antitumoral, a serem futuramente caracterizados (HOA et al., 2011).

1.2.2 Microalgas como fábricas de compostos bioativos

A biomassa de algas tem sido usada há séculos na alimentação, no entanto, recentemente a biomassa algal ganhou interesse como fonte de produtos químicos e farmacêuticos. Em 2006, o mercado de biomassa de microalgas gerou um volume de negócios de 1,25 bilhões de dólares, enquanto o setor de macroalgas gerou 6 bilhões. Atualmente, o regime de produção requer o uso de extratos em vez de a própria biomassa, devido a requisitos de formulação (consistência, estabilidade, cor, sabor, etc) e bioatividade. Compostos derivados de algas, como carotenoides e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFAs) já estão sendo produzidos em larga escala, pelo seu grande potencial de aplicação biológica e farmacológica (CHOJNACKA; KIM, 2015).

As proteínas de microalgas são de grande interesse devido ao seu relatado potencial terapêutico no tratamento de diversas doenças funcionando como fatores de crescimento, hormônios e imunomoduladores, também podendo ajudar a substituir tecidos danificados (IBAÑEZ; CIFUENTES, 2013). Microalgas como *Chlorella* e *Spirulina* podem ser incluídas em alimentos funcionais para prevenir doenças e danos a células e tecidos devido ao seu rico conteúdo protéico e perfil de aminoácidos (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015).

Carotenóides são um grupo de compostos biologicamente ativos muito visados, por possuírem propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais. O β-caroteno foi o primeiro produto produzido comercialmente a partir de uma microalga (BORGES et al., 2013), e reduziu risco de alguns tipos de câncer e doenças degenerativas em humanos.

Entre os outros pigmentos microalgais, o carotenóide fucoxantina encontrado nas diatomáceas demonstrou atividade anti-inflamatória (ZHAO et al., 2014; MOREAU et al., 2006) e foi capaz de estimular a apoptose em células tumorais (MAEDA et al., 2005). A ficocianina, encontrada em cianobactérias, também mostrou atividade anti-inflamatória através da inibição de liberação de histamina (ESTRADA; BESCÓS; FRESNO, 2001; BHAT; MADYASTHA, 2001). Extratos de *Chlorella sp.* contendo β -caroteno e luteína previniram significativamente a deficiência cognitiva que acompanha a doença de Alzheimer em ratos. Da mesma forma, os carotenóides extraídos de *Chlorella ellipsoidea* e *C. vulgaris* inibiram o crescimento do câncer de cólon (GUEDES; AMARO; MALCATA, 2011b).

Os compostos lipídicos de microalgas mais estudados são os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), o ácido docosahexanóico (DHA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido araquidônico (ARA). Estudos mostraram que os PUFAs possuem efeito protetor contra aterosclerose (MIMOUNI et al., 2012); DHA e EPA apresentaram a capacidade de reduzir problemas associados a acidentes vasculares cerebrais, artrite, hipertensão, colesterol e de agir como agentes anti-inflamatórios. Outros compostos lipídicos com propriedades bioativas interessantes são os esteróis microalgais, que demonstraram redução de colesterol em humanos inibindo sua absorção no intestino (FRANCAVILLA; TROTTA; LUQUE, 2010). A atividade antimicrobiana de microalgas contra patógenos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* também tem sido atribuída aos componentes lipídicos dos extratos microalgais (SMITH; DESBOIS; DYRYNDA, 2010; AMARO; GUEDES; MALCATA, 2011).

Os polissacarídeos são moléculas promissoras no cenário da quimioprevenção, de ocorrência natural e quase universal nos organismos vivos. Atuam em funções estruturais nas paredes celulares, de reserva energética, de proteção, entre outras, podendo ser definidos como polímeros formados por ao menos 10 unidades monossacarídicas unidas por ligações glicosídicas (ASPINALL, 1983). A composição dos polissacarídeos microalgais tem acentuadas diferenças entre espécies, e sua obtenção requer etapas de seleção da matéria-prima, extração e purificação (PAINTER, 1983). Polissacarídeos de macroalgas, como ágar, alginatos e carragenanas são os produtos economicamente mais importantes das algas, usados em diversas áreas industriais principalmente por suas propriedades de geleificação ou espessamento reológico. Porém, questões como a escassez de

matérias-primas e problemas de poluição inerentes ao cultivo de macroalgas tem levado a um aumento nas atividades de pesquisa e desenvolvimento para o cultivo de microalgas (PULZ; GROSS, 2004).

Ambas as microalgas e macroalgas são excelentes fontes de polissacarídeos, atribuídos a várias atividades biológicas com benefícios a saúde, tornando-os compostos interessantes para a aplicação em produtos farmacêuticos, terapêuticos e na medicina regenerativa. Algumas bioatividades já relatadas para polissacarídeos algais, além de antitumoral, são: antibacteriana, anti-viral, anti-inflamatória, anticoagulante, imunomoduladora, antioxidante e antidislipidêmica. As β -(1,3)-glucanas têm sido usadas na cicatrização de feridas por indução da migração de macrófagos; e fucoïdanas em queimaduras na regeneração de tecido epitelial como filmes ou géis (SEZER et al., 2007).

Além de todos esses compostos, algumas espécies de microalgas também têm sido empregadas na agricultura como biofertilizantes e bioestimulantes de solos e plantas, pela ação dos hormônios vegetais contidos nas microalgas como *Chlorella pyrenoidosa*, *Scenedesmus armatus*, *Nannochloropsis* oceânica (MAZUR; KONOP; SYNAK, 2001; STIRK et al., 2013a; b). Outros estudos descrevem as vantagens do uso das microalgas para produção de biocombustíveis (biodiesel, bioetanol, biogás e hidrogênio), reduzindo impactos ambientais (GOUVEIA; OLIVEIRA, 2009; NOBRE et al., 2013; MILANO et al., 2016).

1.2.3 Compostos microalgais com ação antitumoral

Muitos compostos são ativos contra as células cancerosas, bloqueando seu crescimento, induzindo apoptose ou afetando seu metabolismo e sinalização celular (BOROWITZKA, 1995; KHORSHID; RAHIMALDEEN; AL-AMRI, 2011). A triagem de extratos brutos desempenha um papel importante no processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, e testes de citotoxicidade contra linhagens tumorais são os métodos mais comuns para avaliar compostos anti-câncer (UMAMAHESWARI; GOVINDAN, 2007).

A quimioprevenção é definida como o uso de agentes naturais ou sintéticos, (carotenóides, ácidos graxos, polissacarídeos e outras moléculas) para reverter, suprimir ou prevenir a progressão do câncer. Existem diferentes mecanismos pelos quais estes quimiopreventores agem. Por exemplo: vários compostos microalgais

como os carotenóides, tocoferóis e ácido ascórbico podem induzir a atividade de sistemas enzimáticos de desintoxicação, como a glutathione S-transferase (GST). Outros componentes como compostos fenólicos, vitaminas e flavonóides reagem com as formas eletrofílicas de carcinógenos, capturando moléculas conjugadas e eliminando-os. Os extratos microalgais também possuem efeitos benéficos na supressão de diferentes efetores da carcinogênese, podendo inibir o metabolismo do ácido araquidônico e da poliamina e atividade da proteína quinase C, atividades estas relacionadas ao fitoestrogênio e ficocanina (EL-BAKY; EL-BAROTY, 2013).

Noda *et al.* (1996), isolaram e identificaram um glicopeptídeo do meio de cultura de *Chlorella vulgaris* com um esqueleto de β -1,6-D-galactopiranosose unida a uma sequência de 15 aminoácidos no terminal NH₂ com atividade antitumoral. Extratos vitamínicos de 7 cepas de clorófitas foram provados como potenciais agentes quimiopreventivos por induzirem a atividade da GST (EL-BAZ *et al.*, 2002). Outra pesquisa demonstrou atividade antimicrobiana e antitumoral contra algumas linhagens MCF-7 (adenocarcinoma da mama humano), CEM (leucemia linfoblastoide humana) e G361 (melanoma maligno humano) por extratos de microalgas dos gêneros *Desmococcus*, *Chlorella* e *Scenedesmus* (ÖRDÖG *et al.*, 2004).

Os polissacarídeos apresentam uma série de atividades biológicas, diretamente relacionadas com suas características estruturais. Dentre estas características estão o nível de ramificações na cadeia principal, presença e distribuição de diferentes grupos funcionais ao longo da cadeia, peso molecular, composição monossacarídica e estereoquímica (DAMONTE; MATULEWICZ; CERESO, 2004; GHOSH *et al.*, 2009). Todos esses fatores variam em função da família, gênero e espécie da microalga, por este motivo o potencial de apresentarem diferentes propriedades biológicas é tão grande (BAO *et al.*, 2001; TALYSHINSKY; SOUPRUN; HULEIHEL, 2002).

Verificou-se que alguns polissacarídeos de microalgas exibem atividade contra retrovírus, estando estes vírus implicados em vários tipos de leucemias e outros tumores. A exemplo dos polissacarídeos da microalga vermelha de água doce *Porphyridium sp.*, que foram ativos contra o vírus da leucemia murina (MULV) e o vírus do sarcoma murino (MuSV-124) em cultura de células (TALYSHINSKY; SOUPRUN; HULEIHEL, 2002); e polissacarídeos sulfatados da microalga marinha *Cochlodinium polykrikoides* que demonstraram atividade contra o vírus da

imunodeficiência humana e ausência de efeito citotóxico contra as células do hospedeiro (HASUI et al., 1995).

Diversos polissacarídeos possuem habilidade de ativar o sistema imunológico, porém os mais ativos já descritos são as β -D-(1,3)-glucanas, também chamadas de laminaranas (BOHN; BEMILLER, 1995). Sua habilidade de estimular a imunidade faz com que estas glucanas sejam chamadas de modificadoras de resposta biológica (BRM “biological response modifiers”) (BOHN; BEMILLER, 1995; KIM et al., 2000). O composto bioativo mais importante da microalga *Chlorella* pode ser considerado a β -1,3 glucana, um imunoestimulador ativo que reduz os radicais livres e o colesterol no sangue, além de ter ação preventiva contra aterosclerose e hipercolesterolemia, bem como atividade antitumoral (MORAIS et al., 2015).

Em muitos trabalhos de pesquisa a atividade imunomoduladora é associada à capacidade de inibir a carcinogênese, já que sabidamente o estresse oxidativo pode levar ao câncer. Jiao et al., (2009), descobriram que uma ramnana sulfatada e alguns derivados da alga marinha verde *E. intestinalis* suprimem o crescimento de células tumorais *in vivo*, mas não mostraram citotoxicidade *in vitro* (RAPOSO; MORAIS; MORAIS, 2015). Polissacarídeos da microalga de água doce *Spirulina platensis* e espécies relacionadas, demonstraram ser mais de 100 vezes mais imunoativos que as preparações polissacarídicas de outras fontes biológicas utilizadas clinicamente para imunoterapia do câncer (PUGH et al., 2001).

Os polissacarídeos também podem ativar alguns receptores nas membranas de macrófagos, como o receptor TLR-4, o cluster de diferenciação CD14, o receptor competente CR-3 e o receptor sequestrador SR, aumentando a produção de NO, que, por sua vez, desencadeia apoptose (TERUYA et al., 2009). As propriedades anti-adesivas de polissacarídeos algais também são importantes, pois bloqueiam a adesão de células tumorais à membrana basal (ROCHA et al., 2005), como por exemplo, o polissacarídeo sulfatado de *Cladosiphon* que mostrou prevenir o câncer gástrico *in vivo*, inibindo a adesão de *H. pylori* à mucosa do estômago (SHIBATA et al., 2003).

O aparecimento de metástase também pôde ser reduzido por uma laminarana sulfatada, pela degradação de componentes na membrana basal e matriz extracelular (MIAO et al., 1999); enquanto uma fucoidana sulfatada de *C. okamuranus* exibiu atividade antiproliferativa sobre células U937 por indução de apoptose seguindo uma via dependente de caspases (TERUYA et al., 2007). A

espirulana cálcica (Ca-SP) é um polissacarídeo de *Spirulina platensis* que inibiu a invasão tumoral e metástase (WIJESINGHE; JEON, 2012).

Observou-se que os polissacarídeos ácidos de *S. platensis* estão envolvidos na atividade macrofágica (YIM et al., 2007), também sendo capazes de suprimir o crescimento das células de glioma RSV-M via regulação parcial da produção de IL-17 e regulação negativa da angiogênese (REYNA-MARTINEZ et al., 2018). Este levantamento bibliográfico demonstra a enorme diversidade e potencial biotecnológico das moléculas produzidas pelas algas.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Frente ao cenário da incessante busca por terapias tumorais, e especificamente para o melanoma, tendo em vista o potencial relatado de compostos algais e obtenção de moléculas para este fim, justifica-se a pesquisa para produção de compostos possivelmente inibitórios a células de melanoma B16-F10, oriundos de espécies microalgais pouco exploradas para este fim, visando ampliar as possibilidades futuras na terapêutica do câncer.

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar os efeitos de extratos de *Desmodesmus subspicatus* e *Messastrum gracile* sobre células de melanoma B16-F10. Como objetivos específicos, tem-se:

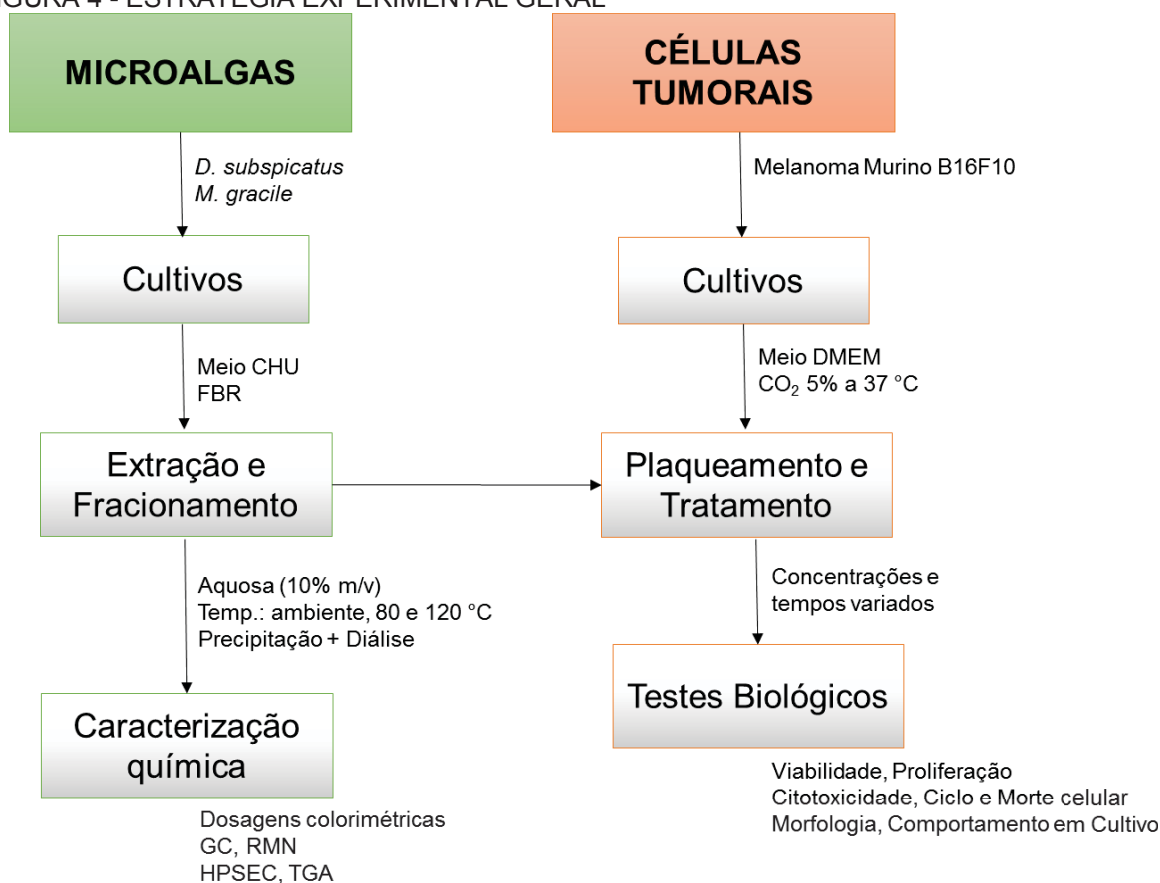
- Realizar extrações aquosas nas biomassas das 2 espécies algais em 3 diferentes temperaturas;
- Fracionar os extratos obtidos a 80 °C;
- Realizar a caracterização química parcial dos extratos por métodos químicos e espectroscópicos;
- Quantificar os efeitos dos extratos sobre células de melanoma B16-F10 em relação a viabilidade, proliferação e toxicidade celular;
- Quantificar os efeitos dos extratos sobre células de melanoma B16-F10 em relação a morfologia celular;
- Quantificar os efeitos dos extratos sobre células de melanoma B16-F10 em relação a dinâmica de adesão celular;
- Quantificar os efeitos dos extratos sobre células de melanoma B16-F10 em relação a dinâmica de migração celular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Tomando uma visão ampla da parte experimental, o trabalho foi dividido em duas etapas, compreendendo: 1) análises químicas e 2) testes biológicos. Cada teste biológico visou avaliar informações acerca do tipo de atividade celular alterada e a que nível se alterou, buscando efeitos relacionados a perda de características tumorais (FIGURA 4).

FIGURA 4 - ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL GERAL



3.2 CULTIVO DAS MICROALGAS

A microalga *Desmodesmus subspicatus* foi cedida pelo Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais (GIA-UFPR) e a *Messastrum gracile* foi cedida pela Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). As biomassas microalgais foram previamente produzidas pelo nosso grupo de pesquisa, seguindo as etapas

resumidas a seguir. As espécies foram inoculadas inicialmente em tubos de ensaio com 10 mL de meio de cultura sintético CHU (adaptado ABNT NBR 12648 – TABELA 1), onde permaneceram por 10 dias. Após esse período os volumes dos tubos foram então transferidos para *erlenmeyers*, completando 200 mL com o mesmo meio de cultura, mantidos por mais 10 dias de cultivo.

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DO MEIO CHU UTILIZADO PARA OS CULTIVOS DAS MICROALGAS *D. subspicatus* e *M. gracile*

COMPONENTES	(g.L ⁻¹)
CaCl₂.2H₂O	2,5.10 ⁻²
C₁₀H₁₄N₂NaO₈	5.10 ⁻¹
FeSO₄.7H₂O	4,9.10 ⁻²
H₃BO₃	1,1.10 ⁻¹
K₂HPO₄	7,5.10 ⁻²
KOH	3,1.10 ⁻¹
MgSO₄.7H₂O	7,5.10 ⁻²
NaCl	2,5.10 ⁻²
NaNO₃	2,5.10 ⁻¹
Co(NO₃)₂.6H₂O	4,9.10 ⁻⁶
MnCl₂.4H₂O	1,4.10 ⁻⁵
Na₂MoO₄.2H₂O	7,1.10 ⁻⁶
ZnSO₄.7H₂O	8,8.10 ⁻⁵
KH₂PO₄	1,7.10 ⁻¹
CuSO₄.5H₂O	1,5.10 ⁻⁵

FONTE: adaptado de ABNT NBR 1264

A escala do cultivo foi então aumentada uma última vez antes de ir para o fotobiorreator (FBR), desta vez as culturas repicadas para *erlenmeyers* de 2 L. Após 12 dias os frascos com cultivos foram inoculados no FBR (depósito de patente nº BR1020160294851) a 10% (v/v) em água esterilizada, por 14 dias.

A temperatura tanto para os *erlenmeyers* quanto para o FBR foi controlada por climatização própria da sala de cultivo (23 °C ± 2 °C), com aeração e agitação constantes (0,25 vvm para o FBR e 1,66 vvm para os *erlenmeyers*) por bombas de ar estéril comprimido, dispersado por aberturas de 1 µm nos *erlenmeyers* e 5-15 µm no FBR. Os cultivos permaneceram sob iluminação fornecida por lâmpadas de led (111,5 µmol.m⁻².s⁻¹), ficando os *erlenmeyers* em estantes com fotoperíodo 12:12 h e o FBR com luz constante em tempo integral.

Os cultivos em FBR foram monitorados diariamente a fim de determinar o crescimento dos cultivos e a produção de biomassa. As análises realizadas consistiram na determinação da concentração celular por contagem direta em microscópio óptico, utilizando câmara de Neubauer; determinação de pH e quantificação da biomassa produzida por metodologia gravimétrica.

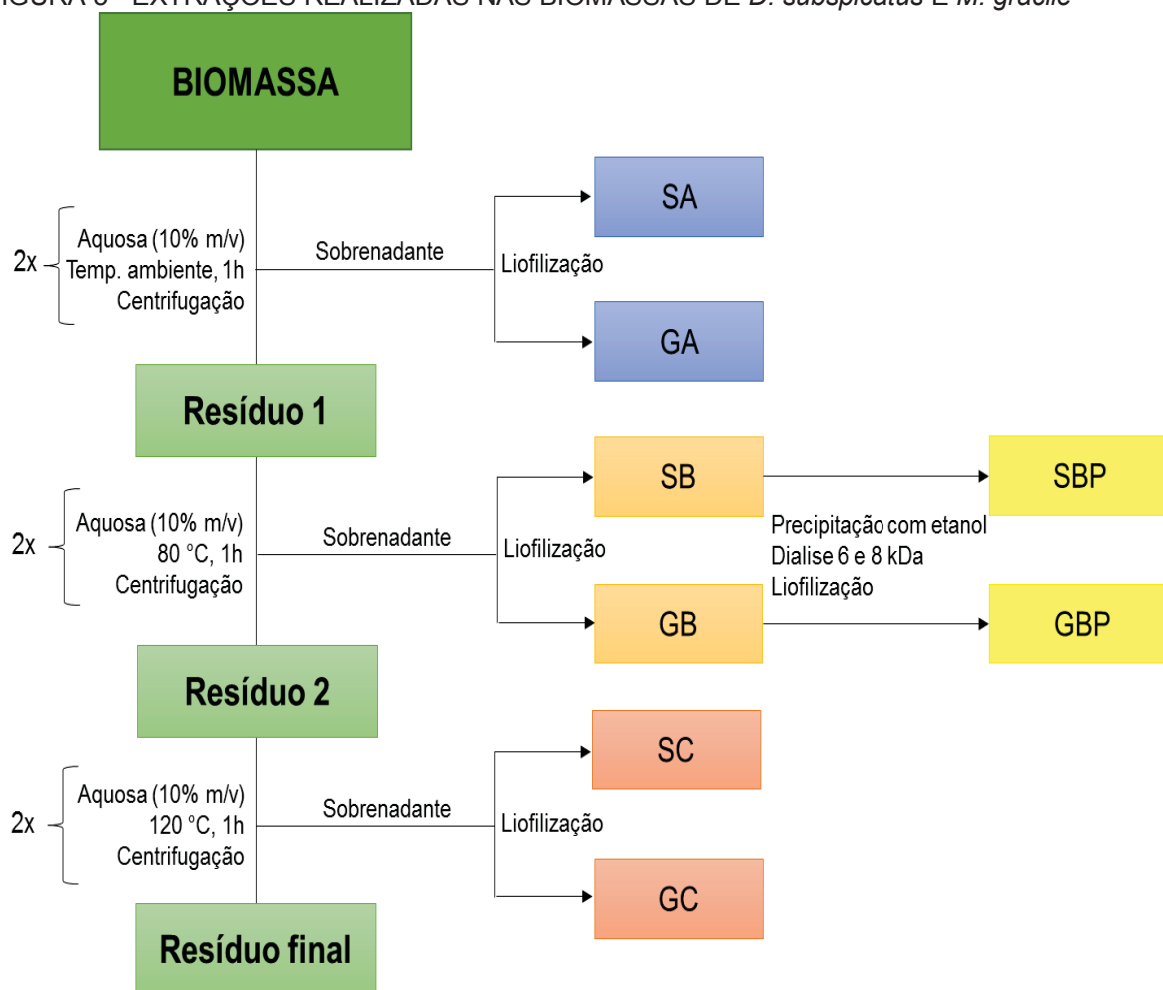
Para a obtenção da biomassa microalgal, o volume total do FBR foi submetido à estratégia de floculação, utilizando quitosana como agente químico no processo. Após concentração da biomassa em volume reduzido, esse concentrado foi submetido a centrifugação, mantendo-se as células precipitadas, sendo a seguir congeladas e secas em liofilizador (Terroni LS 6000 D).

3.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS

A partir da biomassa seca de *Desmodesmus subspicatus* (S) e *Messastrum gracile* (G), foram realizadas três etapas sequenciais de extração aquosa (10% m/v) com gradiente crescente de temperatura (A, B e C), nas seguintes condições: a) extração em temperatura ambiente – extratos SA e GA; b) extração a 80 °C – extratos SB e GB; e c) extração a 120 °C – extratos SC e GC. Em cada etapa a biomassa foi sendo homogenizada em solução por agitador magnético durante 1 hora, sendo a solução resultante centrifugada 20 min a 3500 rpm. O sobrenadante foi reservado e o processo repetido mais uma vez sobre o resíduo (FIGURA 5).

Frações polissacarídicas de ambas as espécies foram purificadas dos extratos brutos SB e GB por meio de precipitação com etanol absoluto 3xV *overnight*, seguida de centrifugação e diálise (membranas celulósicas de 6-8 kDa) dos precipitados, gerando as frações purificadas SBP e GBP.

Ainda, para a utilização dos extratos como tratamentos para testar atividades celulares nas células tumorais, foram feitas soluções-mãe a 1 mg.mL⁻¹ em meio DMEM (Gibco) que foram esterilizadas em filtros de 0,22 µm.

FIGURA 5 - EXTRAÇÕES REALIZADAS NAS BIOMASSAS DE *D. subspicatus* E *M. gracile*

NOTA: SA: extrato de *D. subspicatus* obtido em temperatura ambiente; GA: extrato de *M. gracile* obtido em temperatura ambiente; SB: extrato de *D. subspicatus* obtido em 80 °C; GB: extrato de *D. subspicatus* obtido em 80 °C; SC: extrato de *D. subspicatus* obtido em 120 °C; GC: extrato de *M. gracile* obtido em 120 °C; SBP: fração purificada a partir do extrato de *D. subspicatus* obtido em 80 °C; GBP: fração purificada a partir do extrato de *M. gracile* obtido em 80 °C.

3.4 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

3.4.1 Determinação de proteínas e carboidratos totais

As dosagens desempenhadas nos extratos e frações obtidas seguiram os métodos de Dubois et al. (1956) para açúcares totais e Lowry et al. (1951) para proteínas totais.

Brevemente, para a dosagem glicídica, uma curva-padrão glucose 1:1 galactose a 1 mg.mL^{-1} foi construída para a determinação de carboidratos totais das amostras. Ácido sulfúrico concentrado foi pipetado sobre as soluções amostrais, decompondo os polissacarídeos e produzindo furfural, e ao adicionar o reagente

fenol 5% os produtos condensam gerando cor. Após 20 minutos de homogenização as absorbâncias foram lidas em leitor de microplacas (TECAN INFINITE M200) a 490 nm.

Para a quantificação de proteínas totais, albumina sérica bovina (BSA) foi utilizada como padrão a 1 mg.mL^{-1} . Cada amostra foi adicionada de uma mistura reativa, contendo soluções salinas e do reagente folin, logo após homogenizando por 20 min e na sequência procedendo a leitura das absorbâncias em 660 nm.

3.4.2 Composição monossacarídica por cromatografia gasosa (CG)

As composições monossacarídicas dos oligo e polissacarídeos dos extratos e frações foram determinadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM – Satum 4000), após hidrólise ácida total, redução e acetilação.

Inicialmente 1 mg de cada amostra foi solubilizado em 500 μL de ácido trifluoroacético (TFA) 2 M, mantendo-se em estufa a 100°C por 2 horas (RIZZI, 2010), após isso evaporando o ácido por completo em capela de exaustão por meio de ar comprimido. Os monossacarídeos resultantes foram então ressolubilizados em 500 μL de água destilada e reduzidos com boridreto de sódio sob temperatura ambiente. Após 14 horas foi adicionado ácido acético diluído para neutralização do pH reacional, e o material foi novamente submetido à secagem por ar comprimido em capela de exaustão, sendo em seguida co-destilado 3 vezes com 500 μL de metanol absoluto para remoção de sais. A acetilação com 500 μL de anidrido acético foi realizada na amostra seca a 120°C , e após 1 hora a reação foi interrompida com água destilada e as amostras transferidas para tubos de ensaio com 1 mL de clorofórmio concentrado. A mistura foi agitada, a fase aquosa descartada, e 1 mL de bicarbonato de sódio saturado adicionado, homogenizando-se e descartando a fase aquosa, sendo isto repetido até a estabilização de $\text{pH} = 7$. A fim de retirar os sais formados na neutralização, os tubos foram lavados com água destilada, homogenizando-se e descartando a fase aquosa, repetidas vezes até a queda do pH para entre 5 e 7. Por fim, os acetatos de alditóis permanecem na fase clorofórmica, que foi evaporada, e o tubo seguiu para a análise CG.

Na CG foi utilizada coluna capilar de sílica fundida (30 m X 0,25 mm d.i.) (modelo DB-225), com gás hélio como gás de arraste (sob vazão de 1 mL^{-1}), temperatura inicial de 50°C aumentando até 220°C (a um fluxo de 40°C por

minuto), mantendo-se então constante durante o tempo de análise (25 minutos). Os cálculos das áreas dos picos foram determinados por integração, no software Varian WS, e a análise feita através de comparação entre tempos de retenção das amostras e dos padrões.

3.4.3 Deslocamentos químicos por ressonância magnética nuclear (RMN)

Outra análise química feita a fim de se identificar os perfis moleculares dos extratos foi a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), em espectrômetro Bruker Advance DRX400 (Bruker Germany), sob frequência base de 400 MHz, com temperaturas de análise variando de 30 a 70 °C conforme a temperatura de extração da amostra. Os extratos aquosos, brutos e purificados, foram diluídos em D₂O 99% para experimentos de próton (¹H) a 15 mg.mL⁻¹; e em D₂O 1:1 H₂O na concentração de 30 mg.mL⁻¹ para carbono (¹³C) em tubos de 5 mm de diâmetro. Acetona foi utilizada como padrão interno de calibração para determinar os deslocamentos químicos de todas amostras, para ambos os experimentos (¹H: 2,224 e ¹³C: 30,20).

3.4.4 Perfil de eluição por cromatografia de exclusão (HPSEC-MALLS-RID)

A cromatografia de exclusão por tamanho de alta performance (*High Pressure Size Exclusion Chromatography* - HPSEC) acoplada a laser de espalhamento de luz multiângulos (*Multi Angle Light Scattering* - MALLS) e detector de índice de refração (*Refraction Index Detector* - RID) foi desempenhada para verificar o grau de homogeneidade e distribuição molecular por tamanho das frações purificadas. A análise ocorreu em cromatógrafo (Waters 2410) com espalhador de luz multiângulos (Waytt Technology, Dawns DSP) de 18 canais seriados, sendo utilizadas quatro colunas de gel permeação (Waters) em série, com limites de exclusão de 7.10⁶, 4.10⁵, 8.10⁴ e 5.10³ g mol⁻¹. As amostras foram preparadas diluindo 1 mg de cada uma em 1 mL de eluente, composto por nitrito de sódio (NaNO₂ 0,1 M) e azida de sódio (NaN₃ 200 ppm) dissolvidos em água ultrapura, com posterior filtração (membranas de acetato de celulose 0,22 µm, Millipore). A análise foi realizada utilizando-se injeções de 100 µL de solução com fluxo de 0,6 mL⁻¹. Os dados foram analisados através do software ASTRA.

3.4.5 Perfil de degradação por termogravimetria (TGA)

A análise termogravimétrica (*Thermo Gravimetric Analysis* - TGA) foi utilizada para avaliar a perda de massa (em razão do aumento de temperatura) dos compostos presentes nos extratos microalgais. Os ensaios foram realizados em equipamento STA 449 (Netzsch). As amostras (5 mg) foram aquecidas em cadinho de alumina (Al_2O_3), entre 25-800 °C, com taxa constante de aquecimento de 10 °C por minuto em atmosfera de nitrogênio.

3.5 CULTIVO E TRATAMENTO DAS CÉLULAS TUMORAIS

Para realizar a bateria de estudos *in vitro* a fim de avaliar os efeitos dos extratos sobre células tumorais, a linhagem B16-F10 de melanoma murino, oriunda do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foi cultivada em garrafas (Jet Biofil e TPP) com meio DMEM (DULBECCO; FREEMAN, 1959) (Gibco) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (Gibco), 1 mM de tampão Hepes e 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de antibióticos penicilina-estreptomicina (Gibco) em 0,85% salina (TABELA 2).

Primeiramente, as células de uma alíquota estoque foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C e re-solubilizadas em DMEM 10% SFB em capela de fluxo laminar, centrifugadas 3 min, 1800 rpm, para lavagem, ressuspensas e contadas para transferência de $4,5 \cdot 10^4$ células para garrafas de cultivo.

As células permaneceram em incubadora de CO_2 5% a 37 °C por 3-4 dias, com troca de meio a cada 2 dias, até atingirem confluência visual de 90%. Neste ponto as células foram então soltas com tripsina (Gibco), lavadas 2 vezes com PBS 1X estéril e ressuspensas em DMEM 10% SFB para contagem em câmara de Neubauer, sendo transferidas para placas de cultivo de tamanhos consoantes a necessidade de cada análise, assim como o número células. Passadas 24 horas do plaqueamento, foram adicionados os tratamentos (extratos microalgais) nas concentrações e tempos pretendidos, dependendo do tipo de análise.

TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO CELULAR DMEM

Aminoácidos	g.L ⁻¹
Glicina	0,03
Cloridrato de L-Arginina	0,084
L-Cistina 2HCl	0,063
L-glutamina	0,584
Cloridrato de L-histidina-H ₂ O	0,042
L-Isoleucina	0,205
L-Leucina	0,105
Cloridrato de L-lisina	0,146
L-Metionina	0,03
L-fenilalanina	0,066
L-Serina	0,042
L-Treonina	0,095
L-Triptofano	0,016
Sal dissódico di-hidratado de L-tirosina	0,104
L-Valina	0,094
Vitaminas	g.L ⁻¹
Cloreto de colina	0,004
D-pantotenato de cálcio	0,004
Ácido fólico	0,004
Niacinamida	0,004
Cloridrato de piridoxina	0,004
Riboflavina	0,0004
Cloridrato de tiamina	0,004
i-Inositol	0,0072
Sais inorgânicos	g.L ⁻¹
Cloreto de cálcio (CaCl ₂) anidro	0,2
Nitrato férrico (Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O)	0,0001
Sulfato de magnésio (MgSO ₄) anidro	0,09767
Cloreto de potássio (KCl)	0,4
Cloreto de sódio (NaCl)	6,4
Fosfato de sódio monobásico	0,125
Outros	g.L ⁻¹
D-Glucose (Dextrose)	4,5
Fenol Red	0,015

FONTE: (DULBECCO; FREEMAN, 1959)

3.6 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE E PROLIFERAÇÃO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS

Os primeiros testes de viabilidade e proliferação celular consistiram de um *screening* de atividade frente aos extratos brutos (SA, GA, SB, GB, SC, GC), nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg.mL⁻¹ (n=3), pelos tempos de 24 h, 48 h e 72 h, sendo procedidas as análises antes de fechar o tempo final de cada tratamento, como segue. Foram plaqueadas 600 células por poço em placas de 96 poços (P96 -

Kasvi), com 5 experimentos independentes para Cristal Violeta e Vermelho Neutro, e 3 para o MTT, sempre comparando-se com os controles de células não tratadas.

3.6.1 Ensaio de viabilidade celular por vermelho neutro

A primeira medição realizada foi a de viabilidade celular utilizando o corante vermelho neutro, que é endocitado por células viáveis ficando retido nos lisossomos. Nas 2 últimas horas do tempo final de cada tratamento – ou seja, nos tempos 22 h, 46 h, 70 h – as placas foram retiradas da incubadora e adicionou-se 20 μL de solução de vermelho neutro estéril aos poços (concentração final de 100 mg.mL^{-1}) em cabine de fluxo laminar, retornando para a incubadora. Duas horas depois as placas foram levadas à bancada e todo o conteúdo dos poços foi vertido na pia, em seguida adicionados 100 μL de PBS 1X para lavagem e após 100 μL de solução de eluição (etanol/ácido acético glacial 50%/10% em água ultrapura) deixando em homogenizador de placas (Biotek, Epoch) por 20 minutos até a leitura das absorbâncias a 550 nm (Borenfreund e Puerner 1984; Fotakis e Timbrell 2006).

3.6.2 Ensaio de proliferação celular por cristal violeta

Na sequência da leitura das absorbâncias do teste de Vermelho Neutro, da placa foi descartado o conteúdo dos poços, lavados 2 vezes com PBS 1X e adicionados 100 μL de solução de cristal violeta 0,2% em etanol 2% – a qual se liga às membranas plasmáticas celulares. Após 15 minutos na bancada a placa foi vertida na pia para esvaziamento dos poços e 100 μL de ácido acético 33% foram adicionados, permanecendo 20 minutos sob homogenização e logo prosseguindo a leitura das absorbâncias em 550 nm (GILLIES; DIDIER; DENTON, 1986).

3.6.3 Ensaio de viabilidade celular por MTT

O método MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, SIGMA) consiste em um teste de atividade enzimática que remete à citotoxicidade de compostos, através da conversão do anel tetrazólio do reagente MTT (amarelo) à cristais formazan (roxo) pelas redutases mitocondriais quando a célula está ativa metabolicamente. Para tal, 600 células por poço foram plaqueadas em P96 e tratadas com os extratos

brutos e agora também os purificados (SBP, GBP) nas concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em triplicata, por 24, 48 e 72 h.

Nas 3 últimas horas do tempo final de cada tratamento as placas foram retiradas da incubadora e adicionou-se 20 μL de solução de MTT estéril aos poços (concentração final de 0,45 mg.mL^{-1}) em capela de fluxo laminar, retornando para a incubadora. Três horas depois as placas foram levadas à bancada e todo o conteúdo dos poços foi vertido na pia, em seguida adicionados 100 μL de DMSO para solubilização dos cristais de formazan, homogenizando-se e deixando 20 minutos na bancada até a leitura das absorbâncias em 550 nm (MOSMANN, 1983; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). A análise obteve 3 experimentos independentes e os controles consistiram de células não tratadas.

3.7 ANÁLISES DE CICLO E MORTE CELULAR

Para ambos os testes, Ciclo e Morte Celular, foram plaqueadas 13.000 células por poço, em placas de 6 poços (P6), e os tratamentos SA, GB, SBP e GBP foram aplicados nas concentrações 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ pelos tempos 48 e 72 h. Os dados coletados foram analisados no *software* Flowing 2 (Turku Centre for Biotechnology).

3.7.1 Detecção de estágios do ciclo celular por iodeto de propídeo

A fim de averiguar se o efeito dos tratamentos atingia o ciclo celular das células tumorais, o reagente PI+RNase (BD Pharmingen 550825) foi aplicado como intercalante de DNA, emitindo fluorescência para leitura em citômetro de fluxo, permitindo a identificação das diferentes fases do ciclo (G1, S, G2, M). O fundamento da análise é que células nas fases M e G2 tem o dobro de conteúdo de DNA que células em G1, enquanto que o conteúdo de DNA na fase S situa-se entre esses extremos (ALBERTS et al., 2006).

Passados os tempos de tratamento (48 e 72 horas), o meio de cultura presente nos poços da placa onde permaneceram as células foi descartado e estes foram lavados com PBS 1X, desaderindo as células com *scrapers* (Sarstedt) e transferindo o conteúdo dos poços para tubos de ensaio. Os tubos foram centrifugados a 1800 rpm por 3 minutos, o sobrenadante descartado e as células

foram então ressuspensas em 1 mL de paraformaldeído 1% (EMS) para fixação. Após 30 minutos os tubos foram lavados mais 2 vezes com PBS (adicionando PBS, centrifugando e descartando o sobrenadante) e as células foram ressuspensas em 400 µL de álcool 70%, sendo mantidas em freezer a -20 °C por 72 h. Passado este período os tubos foram centrifugados e as células lavadas 2 vezes com PBS 1X, sendo adicionados 250 µL de PI RNase aos tubos ficando por 15 minutos no escuro. As células foram quantificadas em citômetro FACScalibur (Becton-Dickinson Immunocytometria Systems, USA) logo após serem centrifugadas e ressuspensas em 500 µL de PBS, em uma análise de 10.000 eventos, com auxílio do software Cell Quest.

3.7.2 Detecção de morte celular por Anexina-V e 7-AAD

Para a detecção de morte celular foi utilizado o reagente anexina-V+FITC (BD Pharmingen 556547), que liga-se à fosfatidilserina exposta nas membranas de células em apoptose e conferindo fluorescência para análise de citometria. Seis horas antes de fechar cada tempo de análise foi adicionada camptotecina a um poço não tratado para indução de apoptose (controle positivo de apoptose). Após o término do período de exposição aos tratamentos, o conteúdo de cada poço foi transferido para tubos sobre gelo, e os poços da placa foram lavados com 1 mL de PBS 1X, sendo o volume de lavagem retornado aos tubos. Os poços foram tripsinizados (500 µL de tripsina) por 5 minutos, lavados novamente com PBS 1X e os tubos foram centrifugados a 1800 rpm por 3 minutos, sendo descartado o sobrenadante. Foi adicionado 1 mL de PBS 1X a cada tubo e homogenizado para a contagem de células em câmara de Neubauer, a fim de calcular o volume a se retirar do tubo para que permanecessem 10.000 células.

Procedida a contagem, os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes descartados, o pellet foi ressuspendido em 200 µL de tampão (Annexin V Binding Buffer, diluído 10x em água ultrapura, resultando em uma concentração final de 10mM HEPES/NaOH 140mM NaCl, 2,5mM CaCl₂, pH 7,4) e 2,5 µL de anexina e 5 µL de 7-AAD foram adicionados aos tubos, permanecendo 15 minutos no escuro para a marcação. Para a quantificação por citometria de fluxo, mais 300 µL do mesmo tampão foram adicionados aos tubos, e a seguir foi realizada análise de citometria.

3.8 ENSAIOS MORFOLÓGICOS

Para se procederem as análises de morfologia celular, foram plaqueadas 5.000 células sobre lamínulas circulares de vidro (TMS) em placas de 24 poços contendo 500 μL de DMEM 10% SFB e deixadas por 24 horas para aderência. Os tratamentos SA, GA, SBP e GBP foram aplicados na concentração de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ em duplicata por 72 h.

3.8.1 Morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) permite a visualização de alterações celulares ultraestruturais. Para tal, as células foram fixadas em solução de Karnovski (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, CaCl_2 1 mM em tampão cacodilato de sódio 0,1 M) por 1 hora, após 4 lavagens com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4 a 37 °C). Feitas as lavagens, as células permaneceram em tampão cacodilato de sódio 0,1 M a 4 °C até o momento do processamento para a MEV. Para a análise de MEV as células foram desidratadas sucessivamente com etanol em concentrações crescentes (30, 50, 70, 90%, duas vezes 100%), por 10 minutos em cada solução. As amostras foram então submetidas à secagem completa por ponto crítico no aparelho CPD 010 (Balzers), e posterior metalização com ouro para não dissipação de elétrons no aparelho SCD 030 (Balzers), sendo em seguida analisadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM 6360 no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

3.8.2 Análise de núcleo e citoesqueleto por microscopia confocal a laser

Para a visualização de alterações morfológicas pela Microscopia Confocal foi feita a fixação das células com paraformaldeído 2%. Após 30 minutos a solução foi retirada, lavando uma vez com PBS 1X e adicionando 400 μL de PBS 1X, acondicionando a placa a 4 °C em geladeira até o momento da marcação.

As células foram marcadas com faloidina (R3710 - Invitrogen) para a visualização do citoesqueleto e com DAPI (D1306 - ThermoFischer) para visualização do DNA. O conteúdo dos poços foi retirado e 120 μL /poço da solução de marcação (saponina 0,01%, DAPI 1:1000 e faloidina 1:20 em 1 mL PBS 1X) foi

adicionado, ficando por 30 minutos no escuro. As células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X, passadas em água ultrapura e montadas em lâminas empregando meio de montagem Fluoromont-G (EMS). As lâminas foram deixadas secando por 2 horas, as lamínulas foram seladas em seu entorno com esmalte incolor e deixadas embaladas a 4 °C até o momento da microscopia, realizada em microscópio de varredura a laser confocal A1RMP (Nikon).

3.9 MEDIÇÕES DE DINÂMICAS CELULARES EM CULTIVO

As últimas análises foram referentes ao padrão de cultivo e comportamento celular, mensurando dinâmicas de adesão – relacionada ao grau de aderência celular pela interação de proteínas de membrana com proteínas de matriz – e migração – relacionada à capacidade migratória das células a um local determinado (*Scratching*).

3.9.1 Ensaio de adesão a matrizes extracelulares

Foram plaqueadas 12.000 células por poço em placas de 6 poços, sendo deixadas por 24 h em incubadora. Os tratamentos SA, GA, SBP e GBP foram aplicados na concentração de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ em duplicata por 72 h. Previamente ao término dos tempos dos tratamentos, foi realizada sensibilização de uma placa de 96 poços com 100 μL com as proteínas de matriz celular fibronectina e matrigel, a 10 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ cada. Após 3 horas na incubadora, toda proteína remanescente não aderida foi retirada, seguindo-se a lavagem dos poços 2 vezes com PBS 1X e acondicionando a placa em geladeira por 12 h.

Passadas 72 horas de ação dos tratamentos e as células atingido confluência de 90%, o meio dos poços foi descartado e as células foram desaderidas com *scraper*, após isso transferindo-as para tubos e ressuspensando-as em 2 mL de DMEM 10% SFB para contagem em câmara de Neubauer. Do tubo de cada tratamento foram plaqueadas 30.000 células na P96 pré-sensibilizada, 2 horas depois retirando-se as células não aderidas e lavando-se os poços 3 vezes com PBS 1X. Células aderidas foram fixadas com metanol absoluto (Merck) por 10 minutos, após sendo lavadas mais 2 vezes com PBS 1X e coradas com cristal violeta 0,2% em etanol 2% por 15 minutos, adicionando 100 μL de PBS 1X para

serem fotografadas em microscópio invertido (LEICA, MPS30) acoplado a máquina fotográfica Nikon Coolpix 4500. Por último, na sequência da microscopia, foi procedida a leitura das absorbâncias em leitor de microplacas em 550 nm, após revelação com solução de citrato de sódio 0,1 M em etanol 50% por 10 min.

3.9.2 Ensaio de migração (Scratching)

O ensaio de migração por *Scratching* foi realizado fazendo-se um risco por poço, com a ponta de uma ponteira de 10 μL . Em sequência foi feito o descarte do meio que havia nos poços e uma lavagem com PBS 1X, após adicionando DMEM sem SFB e mitomicina (SIGMA M4287) a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para impedir a proliferação celular. A placa foi levada imediatamente ao microscópio invertido (LEICA, MPS30) para fotografia dos poços no tempo 0 h, tomando como referência sempre um mesmo campo (definido com auxílio de um risco de caneta permanente feito por fora da placa) após retornando para a incubadora. Este procedimento foi repetido nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h, com o intuito de acompanhar a migração das células até cobrir a área do risco.

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

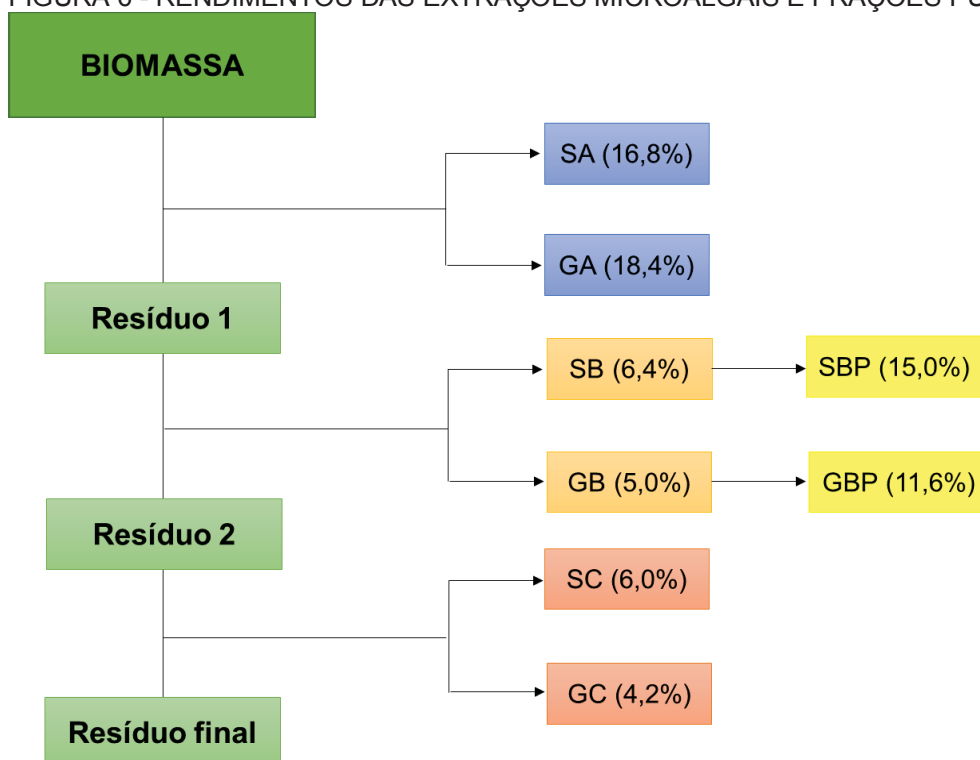
Todos os testes biológicos performados tiveram seus dados estatisticamente analisados por ANOVA e/ou teste T (não paramétrico, com pós teste de Mann Whitney) com auxílio dos softwares GraphPad Prism (version 5.03, GraphPad Software Inc, 2010, San Diego, USA), sempre com no mínimo $n=3$ e considerando nível de significância $p<0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES E PURIFICAÇÕES

Os extratos obtidos sob temperatura ambiente (SA, GA) tiveram rendimentos médios de 16,8% e 18,4%; enquanto os extratos obtidos a maiores temperaturas (SB, SC, GB, GC) tiveram rendimentos menores, de cerca de 1/3 dos obtidos para os extratos ambiente, como demonstrado na FIGURA 6. As purificações feitas nos extratos a quente SB e GB geraram os polissacarídeos SBP e GBP sob rendimentos de 15% e 11,6%.

FIGURA 6 - RENDIMENTOS DAS EXTRAÇÕES MICROALGAIS E FRAÇÕES PURIFICADAS.



NOTA: Rendimentos de frações brutas (SA, GA, SB, GB, SC, GC) obtidos de 3 experimentos independentes, em relação à massa inicial de biomassa seca. Rendimentos de frações purificadas (SBP, GBP) calculados em relação à massa inicial de extratos secos.

Das extrações feitas na biomassa, pretendia-se obter grupos de moléculas diferindo em tamanho, estrutura química e nível de polaridade: dos extratos brutos, principalmente moléculas de baixa massa (aminoácidos, peptídeos, oligossacarídeos), pigmentos, além de fitohormônios e glicosídeos já descritos (MAZEPA, 2013; MALBURG, 2016; OLIVEIRA, 2017) e matéria inorgânica (sais). Já

as purificações feitas nos extratos foram selecionadas para obter polissacarídeos, esperando-se obter macromoléculas solúveis (ou parcialmente polares).

Quanto mais extratos e frações quimicamente distintos a testar, maior a possibilidade de se obter a resposta biológica pretendida (inibição de características tumorais). Além disso, são poucos os estudos que investigam atividades antitumorais de extratos de microalgas dulciaquícolas, ainda menos os que utilizam extratos aquosos, e nenhum a testar em melanoma os extratos das espécies microalgais do presente estudo.

4.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA PARCIAL DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

4.2.1 Determinação de proteínas e carboidratos totais

Os resultados das dosagens de carboidratos e proteínas totais realizadas nos extratos e frações são descritos na TABELA 3.

Em relação aos extratos brutos, de forma geral é possível perceber que a porcentagem de carboidratos e proteínas tende a aumentar a medida em que se aumenta a temperatura de extração; com excessão dos extratos obtidos a 80 °C, que apresentaram maior porcentagem de carboidratos comparado aos obtidos em 120 °C. Nos extratos sob temperatura ambiente (SA e GA), e também nos obtidos a 80 °C (SB e GB) os resultados das dosagens colorimétricas performadas parecem subestimados, possivelmente devido a não detecção de moléculas como sulfoquinovose e glicerol (que constituem boa parcela destes extratos) pelas metodologias adotadas.

As frações purificadas (SBP e GBP) demonstraram grande quantidade de proteínas e carboidratos, concentrando estas duas classes de moléculas, confirmando a eficiência do processo de purificação por precipitação com etanol e diálise. Observa-se maior porcentagem de carboidratos segundo as dosagens performadas, sugerindo a prevalência de polissacarídeos nestas frações.

4.2.2 Composição monossacarídica por cromatografia gasosa (CG)

As composições monossacarídicas dos extratos foram obtidas por CG e podem ser visualizadas na TABELA 3.

Em todos os extratos brutos, os monossacarídeos que compõem mais de 70% da porção glicídica identificada são glucose, galactose e manose. Foi possível observar que, nos extratos obtidos em temperatura ambiente (SA, GA), prevalece como principal monossacarídeo a galactose (38% e 60%, respectivamente), seguida de glucose (32% e 25%). Nos extratos obtidos em maiores temperaturas (SB, SC, GB, GC), o monossacarídeo principal é a glucose (51-74%), seguida de galactose ou manose, sendo observado que, quanto maior a temperatura, maior a prevalência de glucose.

TABELA 3 - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E PERCENTUAIS DE CARBOIDRATOS E PROTEÍNAS TOTAIS DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS

Extrato	Carboidratos ^a (%)	Proteínas ^b (%)	Cinzas ^c (%)	Monossacarídeos (mol %) ^e						
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
SA	21,6	16,3	32,7	Tr	Tr	Tr	Tr	27,9	38,5	32,3
SB	35,6	13,2	32,1	Tr	Tr	1,2	Tr	27,8	17,6	51,2
SC	32,4	35,3	31,9	Tr	1,5	1,4	1,0	12,3	9,0	74,6
GA	17,5	12,5	33,9	6,3	0,3	1,0	2,0	5,3	60,2	24,6
GB	34,0	18,8	23,6	7,3	1,6	2,8	3,6	12,0	21,2	51,2
GC	30,0	25,5	21,3	4,6	0,8	3,8	2,5	10,8	7,0	70,2
SBP	44,2	28,2	18,9	22,0	16,0	7,6	4,6	15,7	17,9	16,2
GBP	30,9	24,5	14,7	17,1	6,9	1,9	Tr	23,0	3,6	47,5

NOTA: Determinados pelos métodos: ^aDUBOIS et al. (1956); ^bLOWRY et al. (1951); ^cAnálise Termogravimétrica; ^dDODGSON et al. (1961). ^eMonossacarídeos quantificados em % mol na forma de acetatos de alditóis, por GC-MS. Tr =Traços (< 1 mol %).

Nas frações purificadas observa-se uma maior heterogenidade dentre os constituintes monossacarídicos. Em GBP o constituinte principal é a glucose (47%), seguida de manose (23%) e após ramnose (17%), o que pode indicar a presença de mano-glucanas e ramno-glucanas. Já em SBP obteve-se maior porcentagem de ramnose (22%), e após glucose, galactose, manose e fucose em similares proporções (16-18%), que dificultam inferir com maior precisão a classe do polissacarídeo. Em vista dessas informações pode-se afirmar a presença de heteropolissacarídeos compondo as frações purificadas SBP e GBP.

Dentre os polissacarídeos microalgais mais estudados a glucose é uma das principais unidades monossacarídicas encontradas, porém sendo também identificadas ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose e galactose, em

diferentes proporções. Quanto aos tipos de ligações glicosídicas, a maioria são glucanas α -(1 \rightarrow 4), denominadas amilopectina ou amilose, dependendo da presença ou não de ramificações; entretanto sendo também observadas unidades de glucose β -(1 \rightarrow 3) ligadas, conhecidas como laminaranas (PAINTER, 1983; GRANUM; KIRKVOLD; MYKLESTAD, 2002; FRANCESCHINI, I.M. BURLIGA et al., 2010). Esses estudos demonstram a variabilidade das composições polissacarídicas dentre as microalgas.

4.2.3 Análise dos sinais químicos (RMN)

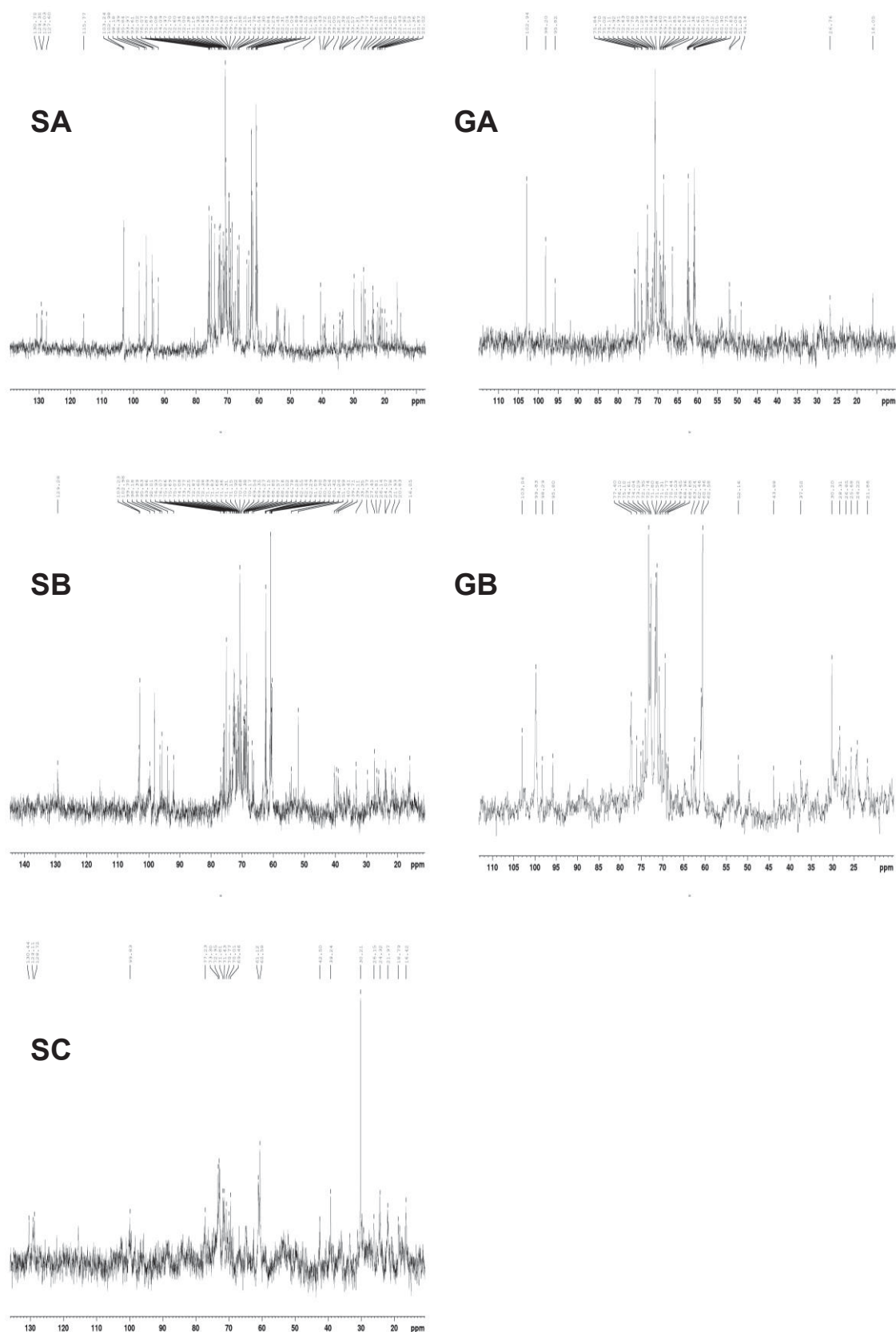
A partir dos extratos foram gerados espectros de RMN de ^{13}C , nos quais foram analisados os sinais (deslocamentos químicos) dos carbonos (FIGURA 7).

De maneira geral, em todos os espectros de ^{13}C observa-se a predominância dos deslocamentos químicos na região de carboiratos (60-110 ppm). Outros sinais com menor intensidade foram observados na região de 45 a 15 ppm, referentes a estruturas proteicas e/ou peptídicas, assim com os sinais entre 130-120 ppm, provavelmente correspondentes a ligações duplas provenientes de aminoácidos aromáticos.

Através da análise dos espectros de RMN, especificamente na região de carboidratos, foi possível identificar sinais provenientes de moléculas de glicosídeos, previamente descritos por Mazepa (2013), presentes tanto nos extratos obtidos a temperatura ambiente (SA e GA) quanto, em menor intensidade, nos obtidos a 80 °C (SB e GB).

Os espectros dos extratos SA e SB mostram 3 principais sinais na região anomérica, relativos às moléculas de sulfoquinovosil-glicerol (FIGURA 8a), digalactosil-glicerol (FIGURA 8b), e monogalactosil-glicerol (FIGURA 8c), previamente descritas para extratos correlatos, como descritos na TABELA 4:

- 1) Em 103,2 ppm, identificado como pertencente ao carbono 1 (C-1) da molécula de β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow (FIGURA 8c);
- 2) Em 102,9/103,0 ppm, pertencente ao C-1 da molécula de \rightarrow 6)- β -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow (FIGURA 8b);
- 3) Em 98,2 ppm, pertencente aos C-1 das moléculas de α -D-sulfoquinovose-(1 \rightarrow (FIGURA 8a), e α -D-galactopiranosose-(1 \rightarrow (FIGURA 8b).

FIGURA 7 - ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C DOS EXTRATOS MICROALGAIS

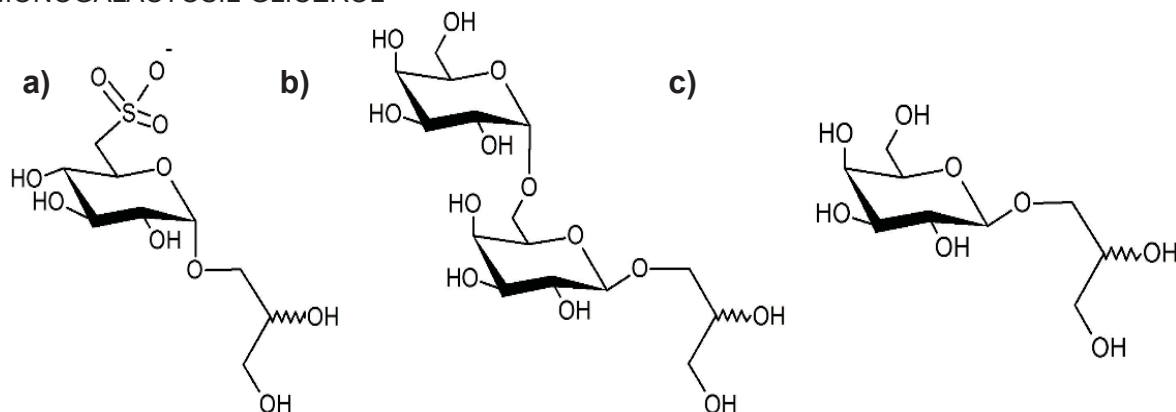
NOTA: Extratos SA e GA analisados a 30 °C, extratos a quente (SB, SC, GB) analisados a 70 °C. Solvente: D_2O .

TABELA 4 - ASSINALAMENTOS DOS ESPECTROS DE RMN RELATIVOS ÀS MOLÉCULAS DE GLICOSÍDEOS PRESENTES NOS EXTRATOS GA E SA OBTIDOS SOB TEMPERATURA AMBIENTE

Sulfoquinovosil-Glicerol							
Unidades	Carbono	Hornes (2018) ^a		Mazepa (2013) ^b	Ruberto; Tringali (2004) ^c	Sasaki et al. (1999) ^d	Roy; Hewlins (1998) ^e
→1)-Glicerol		GA	SA				
	1	68,8	69,1	68,9	-	-	68,8
	2	70,9	70,9	70,9	-	-	70,7
	3	62,5	62,5	62,8	-	-	62,5
α-D-Sulfoquinovose(1→	1'	98,2	98,2	98,2	-	-	98,1
	2'	71,4	71,4	71,4	-	-	71,3
	3'	72,9	73	73,0	-	-	72,8
	4'	72,6	72,6	72,5	-	-	72,3
	5'	68,2	68,1	68,1	-	-	68,0
	6'	52,1	51,9	52,1	-	-	51,9
Digalactosil-Glicerol							
→1)-Glicerol	1	70,9	70,9	70,9	-	72,4	-
	2	70,7	70,7	70,8	-	71,8	-
	3	62,5	62,5	62,5	-	64,0	-
→6)-β-D-Galp-(1→	1'	102,9	103	103,0	-	104,5	-
	2'	70,7	70,7	70,8	-	72,3	-
	3'	72,9	72,7	72,8	-	70,2	-
	4'	69,2	68,6	68,8	-	70,2	-
	5'	74,1	74,1	73,0	-	74,2	-
	6'	66,4	66,5	66,5	-	67,9	-
α-D-Galp-(1→	1''	98,2	98,2	98,3	-	99,7	-
	2''	68,2	68,1	68,3	-	69,8	-
	3''	69,4	69,4	69,3	-	71,0	-
	4''	68,6	68,6	68,8	-	70,8	-
	5''	70,7	70,7	70,8	-	72,5	-
	6''	61,0	61,1	61,2	-	62,7	-
Monogalactosil-Glicerol							
→1)-Glicerol	1	-	70,9	70,8	72,0	71,2	-
	2	-	70,4	70,5	72,2	69,3	-
	3	-	62,5	62,6	64,1	63,0	-
β-D-Galp-(1→	1'	-	103,2	103,2	105,3	104,0	-
	2'	-	71,2	71,0	72,6	73,7	-
	3'	-	73,0	73,0	74,9	71,2	-
	4'	-	68,6	68,8	70,3	71,5	-
	5'	-	75,1	75,2	76,8	75,7	-
	6'	-	60,9	61,0	62,5	61,5	-

NOTA: ^a Presente estudo – solvente: D₂O; ^b solvente: D₂O; ^c solvente: CD₃OD; ^d solvente: CDCl₃-CD₃OD (3:1); ^e solvente: D₂O.

FIGURA 8 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS GLICOSÍDEOS PRESENTES NOS EXTRATOS MICROALGAIS: (a) SULFOQUINOVOSIL-GLICEROL, (b) DIGALACTOSIL-GLICEROL, (c) MONOGALACTOSIL-GLICEROL



NOTA: Descrito por Mazepa (2013).

Os sinais entre 76 ppm e 50 ppm são referentes aos demais carbonos dos anéis monossacarídeos. Sinais na região de 60,9 a 61,1 ppm sugerem a presença de C-6 livres. Já para o extrato SC observou-se apenas um sinal na região anomérica (99,8 ppm), não correspondente a glicosídeos, indicando a presença de apenas um tipo de molécula, provavelmente um polissacarídeo.

Nos extratos de *M. gracile* também foi possível identificar os sinais provenientes dos glicosídeos. Em GA e GB observa-se a presença de um sinal em 98,2 ppm, indicando a presença das moléculas de sulfoquinovosil-glicerol e digalactosil-glicerol, com ausência de sinal em 103,2 sugerindo baixa concentração ou ausência da unidade monogalactosil-glicerol.

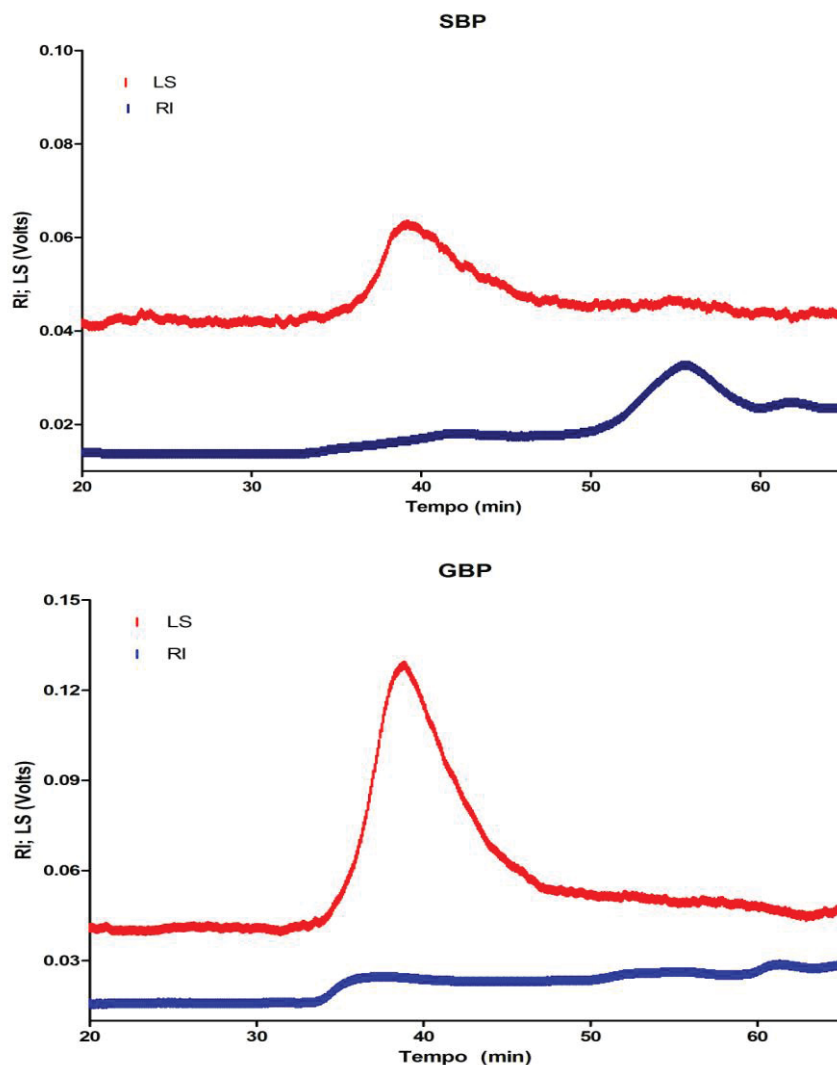
Além dos glicosídeos, também foram identificados em alguns extratos sinais relativos a monossacarídeos livres: em 93,6 e 94 ppm – manose β e α , respectivamente; e em 92,1 e 95,9 ppm – glucose α e β . Não foi possível obter espectros da amostra GC, SBP e GBP, permanecendo inconclusivo se há presença ou não de glicosídeos nestes casos, apesar de não ser esperada a presença dessas moléculas, por possuírem baixa massa molecular e alta solubilidade, sendo consequentemente extraídas nos primeiros processos de extração (à temperatura ambiente e 80 °C).

4.2.4 Perfil de eluição por cromatografia de exclusão (HPSEC-MALLS-RID)

Através da análise cromatográfica foi possível observar a heterogeneidade das frações purificadas SBP e GBP (FIGURA 9). Similarmente para ambas as

frações, no tempo 40 min foram eluídas moléculas de alta massa (pelo espalhamento de luz - LS), apesar de em baixa concentração (pelo índice de refração - RI), relacionadas aos polissacarídeos extraídos. Os picos entre 50 e 60 min referem-se a moléculas menores, que tomando por base o processo de purificação, sugere-se serem peptídeos ou oligossacarídeos.

FIGURA 9 - CROMATOGRAMAS DAS FRAÇÕES PURIFICADAS POR HPSEC-MALLS-RID



4.2.5 Perfil de degradação por termogravimetria (TGA)

A partir da análise termogravimétrica constatou-se que os extratos e frações possuem maior parte de sua composição referente a substâncias orgânicas (FIGURA 10). Nos extratos brutos a porcentagem de matéria inorgânica média foi de 30%, consequentemente possuindo em torno de 70% de matéria orgânica.

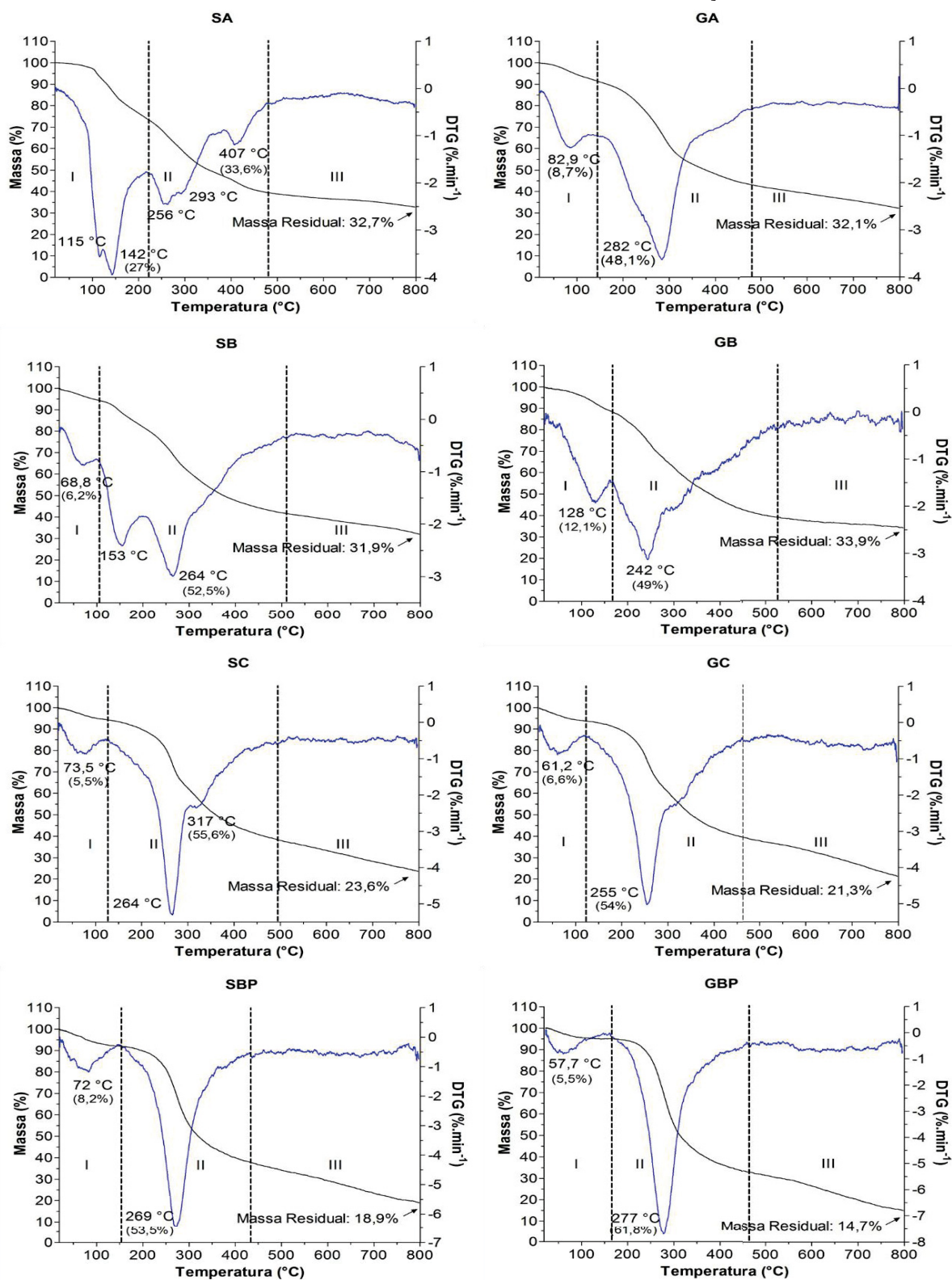
O primeiro evento de degradação (I) ocorreu, em média, entre 21 e 135 °C, para todos os extratos e frações, sem muita variação; com exceção de SA, em que tal evento se prolongou até 221 °C. A perda de massa correspondente a este evento foi em média 7,5%, excetuando-se SA que teve uma perda maior, de 27%. Esta perda foi atribuída como a saída da massa de água (umidade). As diferenças para SA podem ser explicadas pela maior higroscopicidade apresentada por este extrato.

O segundo evento (II), correspondente a maior parte do processo de degradação, foi o com maior variação entre os extratos e frações. Ele inicia-se na faixa de 102-222 °C terminando em 432-524 °C, gerando perdas de massa de 34-62%. Como as análises de RMN indicaram a presença de glicosídeos (sulfoquinovosil-glicerol, digalactosil-glicerol e monogalactosil-glicerol) nos extratos, sugere-se que estas moléculas sejam degradadas no evento II, juntamente com outras moléculas glicídicas e peptídicas.

Outros autores também consideram que estas classes de biomoléculas sejam degradadas nesta faixa de temperatura. Kosmela et al. (2017) identificaram temperaturas de degradação máxima de 228 °C para moléculas de glicerol. Fernandes et al. (2017), obtiveram temperatura máxima de degradação de 250 °C, onde as análises químicas revelaram a presença dos monossacarídeos glucose, manose e galactose. Com base nessas informações o pico entre 250-300 °C nas frações SBP e GBP foram atribuídos a polissacarídeos, e possivelmente este mesmo pico de temperatura nos extratos SA e GA está relacionado a presença dos glicosídeos.

O terceiro evento de degradação (III) ocorreu, em média, acima de 478 °C, se estendendo até a temperatura final do experimento (800 °C), correspondendo a uma perda de massa média de 29% para os extratos brutos e 17% para as frações purificadas. Esta faixa de degradação corresponde ao restante de material não degradado ao decorrer do experimento, ao que se atribui às cinzas (matéria inorgânica). Esse decréscimo de quase 50% no teor de cinzas nas frações purificadas confirma a retirada de sais no processo de diálise, sendo a porcentagem remanescente provavelmente oriunda de contra-íons de grupos ionizáveis (tais como grupos ácidos).

FIGURA 10 - ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS



4.3 AVALIAÇÃO DE VIABILIDADE, DENSIDADE E TOXICIDADE CELULAR DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS

4.3.1 Viabilidade celular por vermelho neutro

O ensaio com Vermelho Neutro (FIGURA 11) forneceu o primeiro indício da perda de viabilidade celular frente aos tratamentos. Já nas primeiras 24 horas foi possível observar redução de viabilidade, na faixa de 27 a 51%, efeito esse observado com maior frequência para os tratamentos nas concentrações de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (GB, SA, SB, SC), exceto para GA, que se mostrou significativo na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (27%). Em 48 h, os mesmos tratamentos (GB, SA, SB, SC) se mantiveram reduzindo a viabilidade celular, na faixa de 37 a 52%; enquanto GA na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não manteve o efeito a nível de significância. Ao 3º dia, os tratamentos em destaque, que mantiveram o efeito de redução de viabilidade, foram GB, SB e SC, nas maiores concentrações (1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

4.3.2 Densidade celular por cristal violeta

Ao medir-se a densidade celular (quantidade de células presentes após a exposição dos tratamentos) não foi possível observar efeito de redução com nenhum tratamento em 24 h (FIGURA 12). A leitura de absorbâncias ao 2º dia (48 h) revelaram uma diminuição de proliferação de 22% para o tratamento SB na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e, de forma inesperada, um aumento na densidade celular na faixa de 17-31% para os tratamentos GA, SA e SB nas menores concentrações. Ao 3º dia, vários tratamentos demonstraram ação de redução de densidade celular, de 22% a 59%, em sua maioria nas maiores concentrações. Quanto ao tratamento SB, observou-se uma possível reversão do quadro anterior (de aumento na densidade em 48 h) mostrando efeito significativo de redução de 34% na densidade celular quando na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ em 72 h.

FIGURA 11 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS PELO TESTE COM VERMELHO NEUTRO

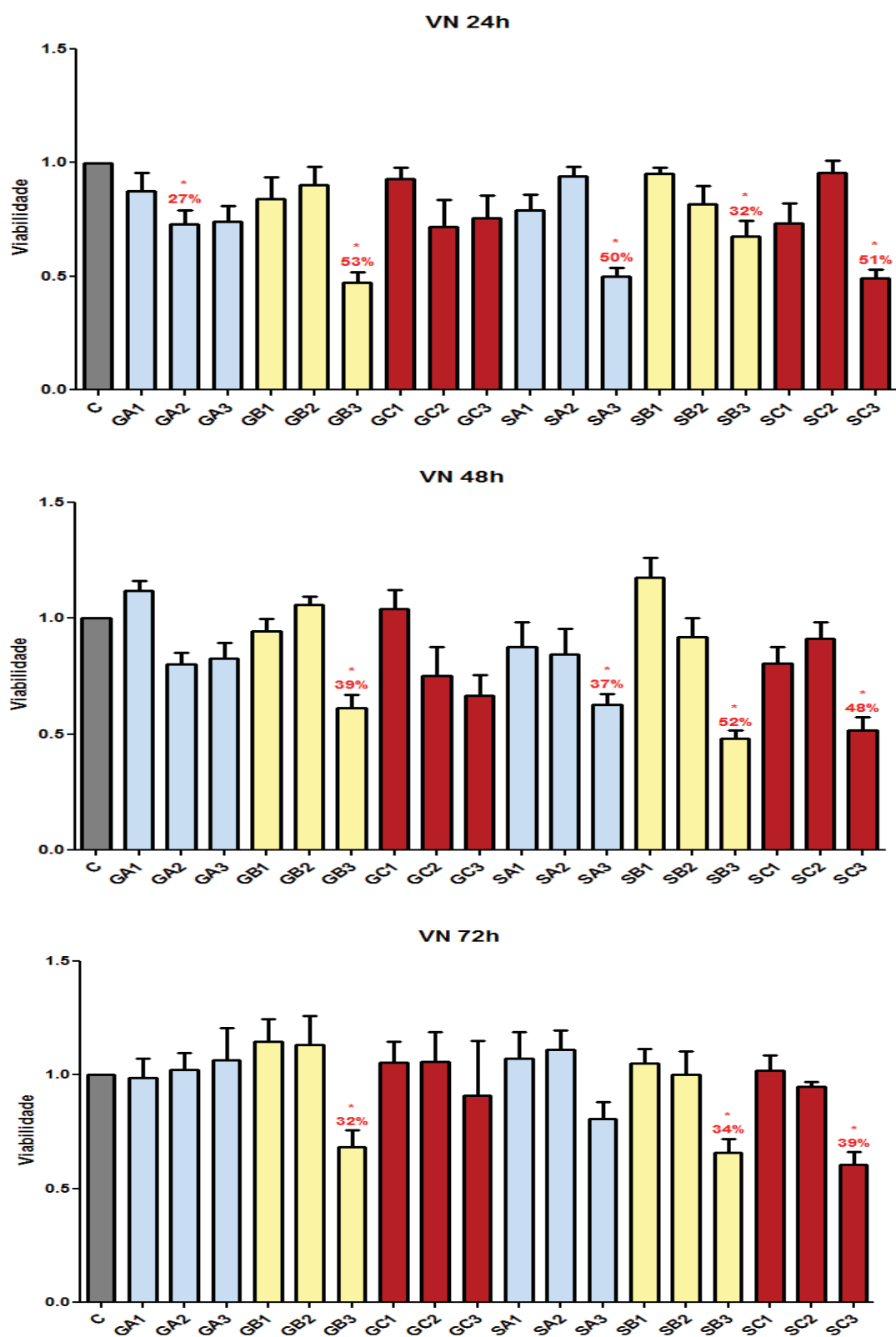
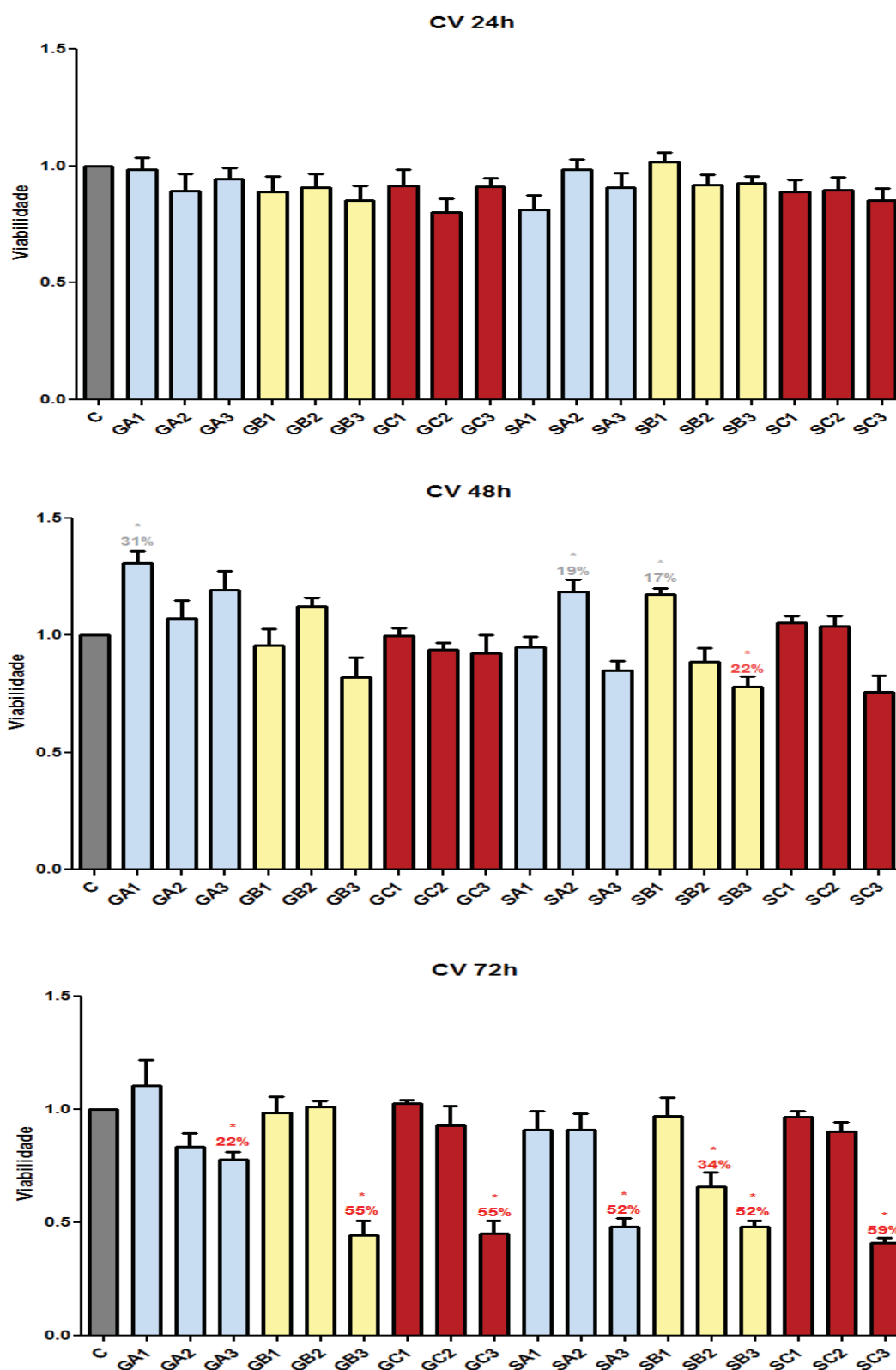


FIGURA 12 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS PELO TESTE COM CRISTAL VIOLETA



4.3.3 Citotoxicidade por MTT

Além dos tratamentos testados anteriormente, as frações SBP e GBP, obtidas a partir dos extratos a quente SB e GB, após processo de purificação, estavam prontas a também passar para os testes biológicos, começando pela triagem de citotoxicidade pelo método MTT, juntamente com os extratos brutos (FIGURA 13).

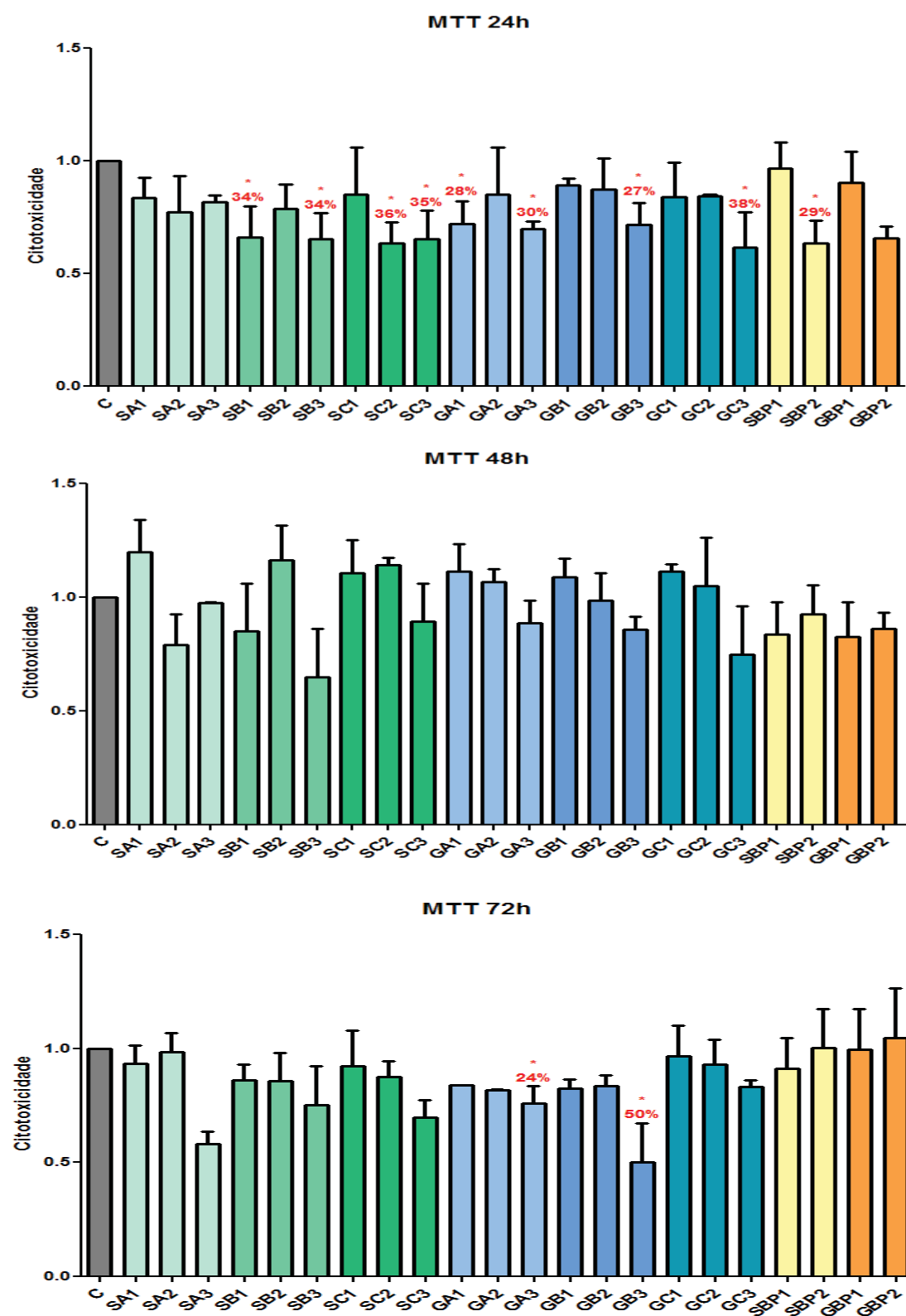
Nas primeiras 24 horas após o tratamento, a análise MTT já revelou uma série de extratos exercendo citotoxicidade às células, e, de forma interessante, não apenas na maior concentração ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os tratamentos SB1, SC2, GA1 e SBP2 diminuíram a viabilidade celular em média em 30%. Na maior concentração, todos os tratamentos também demonstraram efeito citotóxico de cerca de 30%. Em 48 horas, não se observou efeito estatístico para nenhum dos tratamentos testados; enquanto que em 72 horas somente GA3 e GB3 mantiveram o efeito de citotoxicidade.

Comparando extratos brutos e frações purificadas, observou-se discreta melhora no efeito de redução de viabilidade (MTT) quando utilizadas amostras purificadas. Os extratos a quente (80 e 120 °C) mostraram mais resultados positivos quando comparados aos extratos ambiente, e a respeito das concentrações, claramente houve maior citotoxicidade (cerca de 50%) na maior concentração de praticamente todos os extratos testados.

Iniciou-se os experimentos biológicos trabalhando com 4 variáveis simultâneas: 1) a espécie da microalga (*D. subspicatus* ou *M. gracile*); 2) a temperatura de extração (ambiente, 80 °C, 120 °C); 3) a concentração de extrato (10, 100, $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$); e 4) os tempos de exposição celular aos tratamentos (24, 48 e 72 h).

Primeiramente, a respeito do tipo de experimento e atividade celular comprometida, obteve-se mais resultados positivos (relacionados à inibição das células cancerosas) nos experimentos que remetem à viabilidade e toxicidade celular (vermelho neutro e MTT). Quanto aos tempos experimentais, mais resultados positivos foram gerados em 24 h ou 72 h. Não foi observada proporcionalidade entre os resultados dos testes com MTT e vermelho neutro, o que se sustenta no fato de que os métodos avaliam, de fato, qualidades metabólicas distintas.

FIGURA 13 - EFEITO CITOTÓXICO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS POR MTT



Considerando-se os tratamentos empregados como futuros terapêuticos ou aliados no tratamento do melanoma, extrapolando o processo de obtenção dos extratos para escala industrial, tendo em vista os rendimentos e custos do processo; e levando também em conta as doses de tratamentos normalmente empregados na literatura (TORRES et. al, 2005; MOHD SYAHRIL et. al, 2011; SHANAB et. al, 2012), optou-se por focar no efeito dos extratos nas menores concentrações testadas: 10 e 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Portanto, em vista da viabilidade de produção e dados de pesquisas similares, os tratamentos GA1, GA2, SA1, SA2, SBP1, SBP2, GBP1 e GBP2 foram selecionados para as análises de ciclo e morte celular.

4.4 ANÁLISES DE CICLO E MORTE CELULAR

4.4.1 Detecção de estágios do ciclo celular por iodeto de propídeo

A porcentagem de células em cada fase do ciclo celular, de acordo com o tratamento empregado, pode ser visualizada na FIGURA 14 e FIGURA 15. Por meio desta análise foi possível concluir que os tratamentos não interferem significativamente ($p < 0,05$) no ciclo celular, tampouco tendem a fragmentar o DNA, como evidenciado na FIGURA 16.

Foi possível observar que, ao tempo de 48 h de ação dos tratamentos (FIGURA 14), aproximadamente 45% do total de células analisadas encontravam-se em fase G1 do ciclo celular, enquanto 40% encontravam-se em S e 10% em fase G2. Já no tempo de 72 h (FIGURA 15), 60% das células encontravam-se em G1, 30% em S e 10% em G2.

As diferenças entre os tratamentos e controles não se mostraram estatísticas a nível de significância $p < 0,05$ nos 3 experimentos independentes realizados. Todavia, observa-se que os tratamentos SBP1, SBP2, GBP1 e GBP2 chegaram próximos a $p = 0,05$ na quantificação de DNA fragmentado (FIGURA 16), e alguns desvios-padrão amostrais também não foram considerados aceitáveis. Sendo assim, a realização de mais um experimento ainda se faz necessária para confirmar os resultados obtidos.

FIGURA 14 - ESTÁGIOS DO CICLO CELULAR FRENTE A AÇÃO DOS TRATAMENTOS EM 48 h

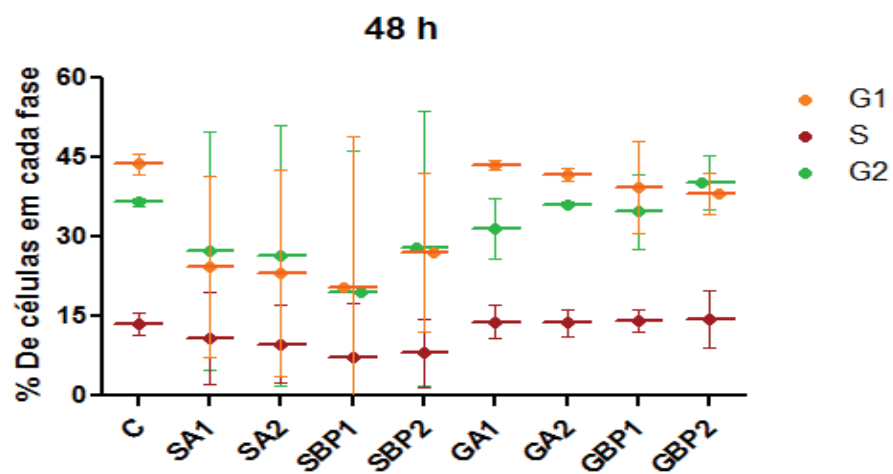


FIGURA 15 - ESTÁGIOS DO CICLO CELULAR FRENTE A AÇÃO DOS TRATAMENTOS EM 72 h

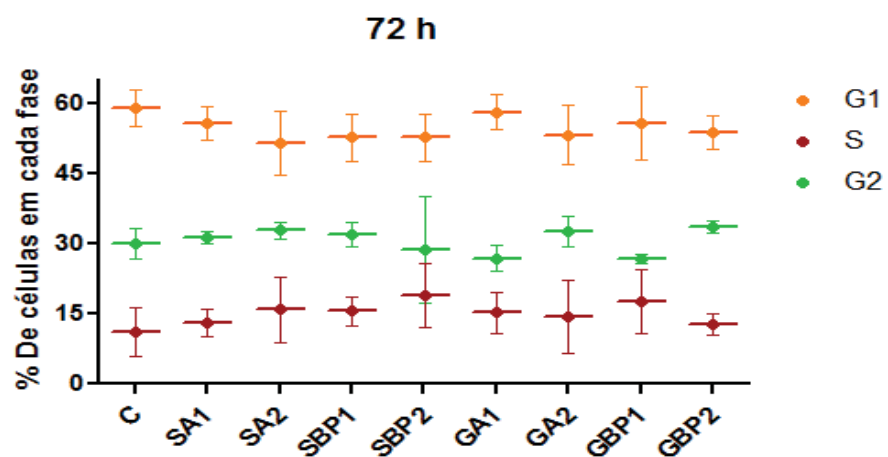
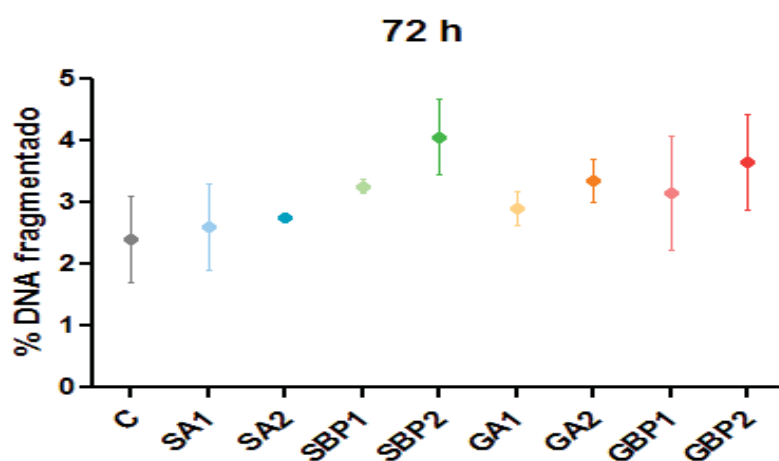


FIGURA 16 - PORCENTAGEM DE DNA FRAGMENTADO FRENTE A AÇÃO DOS TRATAMENTOS

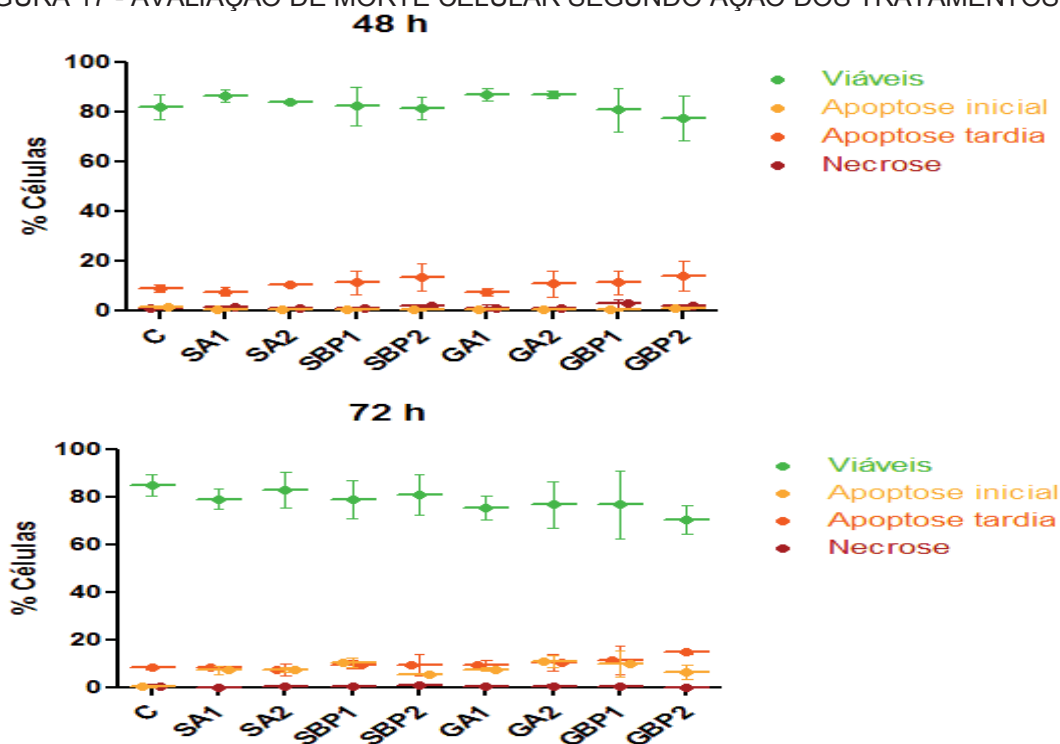


4.4.2 Detecção de morte celular por anexina e 7-AAD

Através da análise de morte celular por anexina e 7-AAD (FIGURA 17) constatou-se que os tratamentos empregados não induzem morte celular, seja por apoptose ou necrose, a nível de significância, nos 3 experimentos independentes realizados. Constatou-se, tanto para o controle quanto para os tratamentos, cerca de 80-85% de células viáveis, 10-15% de células em apoptose tardia e um residual de células (<5%) em apoptose inicial ou necrose no tempo de 48 h. Em 72 h a única diferença observada foi um aparente aumento da porcentagem de células marcadas como em apoptose inicial nos tratamentos em relação ao controle, porém que não foi evidenciado como estatístico ($p < 0,05$).

Por ter-se definido seguir os testes com os tratamentos nas menores concentrações, e tendo estes revelado baixas reduções de viabilidade, citotoxicidade e proliferação, além de ausência de efeito significativo nas análises de ciclo e morte celular, passou-se a esperar tratamentos de contenção tumoral através de outros indícios de comprometimento metabólico, como mudanças na morfologia, migração e adesão celular, sendo estes os próximos testes a serem desempenhados.

FIGURA 17 - AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR SEGUNDO AÇÃO DOS TRATAMENTOS



NOTA: Marcação com 7AAD correspondendo a necrose; marcação somente com anexina correspondendo a apoptose inicial; dupla marcação anexina+7AAD correspondendo a apoptose tardia.

4.5 ENSAIOS MORFOLÓGICOS

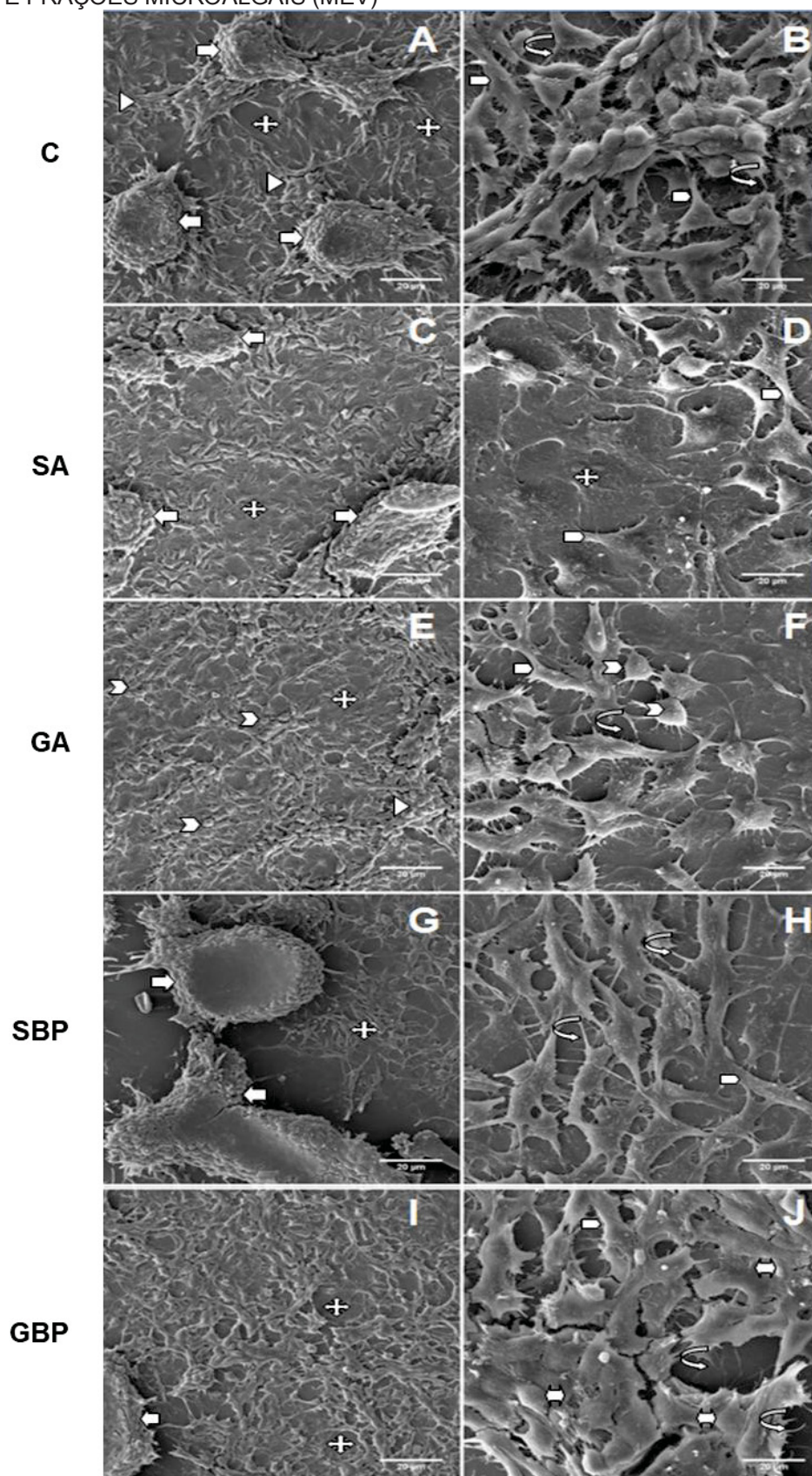
A partir destes próximos testes selecionamos os tratamentos SA, SBP, GA e GBP na concentração intermediária ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pois SA e SBP são os extratos obtidos da espécie *D. subspicatus* em que a estrutura química mais difere, sendo o mesmo raciocínio adotado para a escolha de GA e GBP. Além disso, foi considerado o fato de que estes tratamentos resultaram, cada um, em ao menos um indício de perda de atividade celular por um dos testes anteriormente desempenhados, apesar de serem considerados de baixa citotoxicidade ($<30\%$). Outros estudos também relatam substâncias não citotóxicas que acabaram por promover outros efeitos *in vivo* ou relacionados a migração e adesão *in vitro*, também sendo considerados promissores (HIRAHASHI et al., 2002; LEE et al., 2014; BISCAIA et al., 2017).

4.5.1 Morfologia celular por microscopia eletrônica de varredura (MEV)








Observamos nas imagens A e B (FIGURA 18) células controle mantidas em cultivo por 72 h em presença de meio. Podemos notar, em menor magnitude (imagem A), duas subpopulações distintas: áreas contendo células aderentes, espreiadas, com diferentes morfologias, sem inibição de contato, empilhando umas sobre as outras, característicaS de células tumorigênicas; bem como nódulos formados por agregação de células justapostas formando arquitetura nodular 3-D. Em maior magnitude (B) observamos que estas células apresentam morfologia semelhante àquelas aderidas, contendo inúmeras projeções membranares, além de característicos prolongamentos celulares (filopódios).

Nas imagens C e D observamos a morfologia ultra-estrutural de células tratadas com SA. De forma interessante, o padrão do cultivo apresenta-se distinto dos tratamentos descritos acima. Observa-se uma área central de células bem aderidas, espreiadas, não empilhando umas sobre as outras, adsorvidas com íntimo contato por sobre o substrato, formando uma área de monocamada. Ao redor destas vê-se células menos aderidas e espreiadas, semelhantes ao padrão descrito para as células controle. Chama atenção o tamanho da expansão do corpo celular destas células quando comparado com os demais tratamentos, que parecem estar organizando características fibras de stress (microfilamentos de actina) para manter adesão sobre o substrato.

FIGURA 18 - PADRÃO MORFOLÓGICO DO CULTIVO CELULAR FRENTE A ATIVIDADE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS (MEV)



NOTA: 5.000 células mantidas em cultivo celular, na presença ou ausência de tratamento por período de 72 h. Imagens A, C, E, G, I: aumento de 700x. Imagens B, D, F, H, J: aumento de 2500x. Para este ensaio cada tratamento foi testado em duplicata.

	Esta seta identifica células bem aderidas, espreiadas, formando uma monocamada
	Esta cabeça de seta identifica células espreiadas empilhando umas sobre as outras;
	Esta seta identifica nódulos formados por agregação de células justapostas;
	Esta seta identifica filopódios;
	Esta seta identifica projeções membranares;
	Esta cabeça de seta dentifica células mais arredondadas, livres por sobre o substrato;
	Esta seta identifica células mais justapostas, fusionando-se entre si.

Nas imagens E e F, células tratadas com GA, surge uma terceira sub-população celular, caracterizando-se por células mais arredondadas, livres por sobre o substrato, possivelmente com perda de adesão, hipótese que será confirmada a seguir.

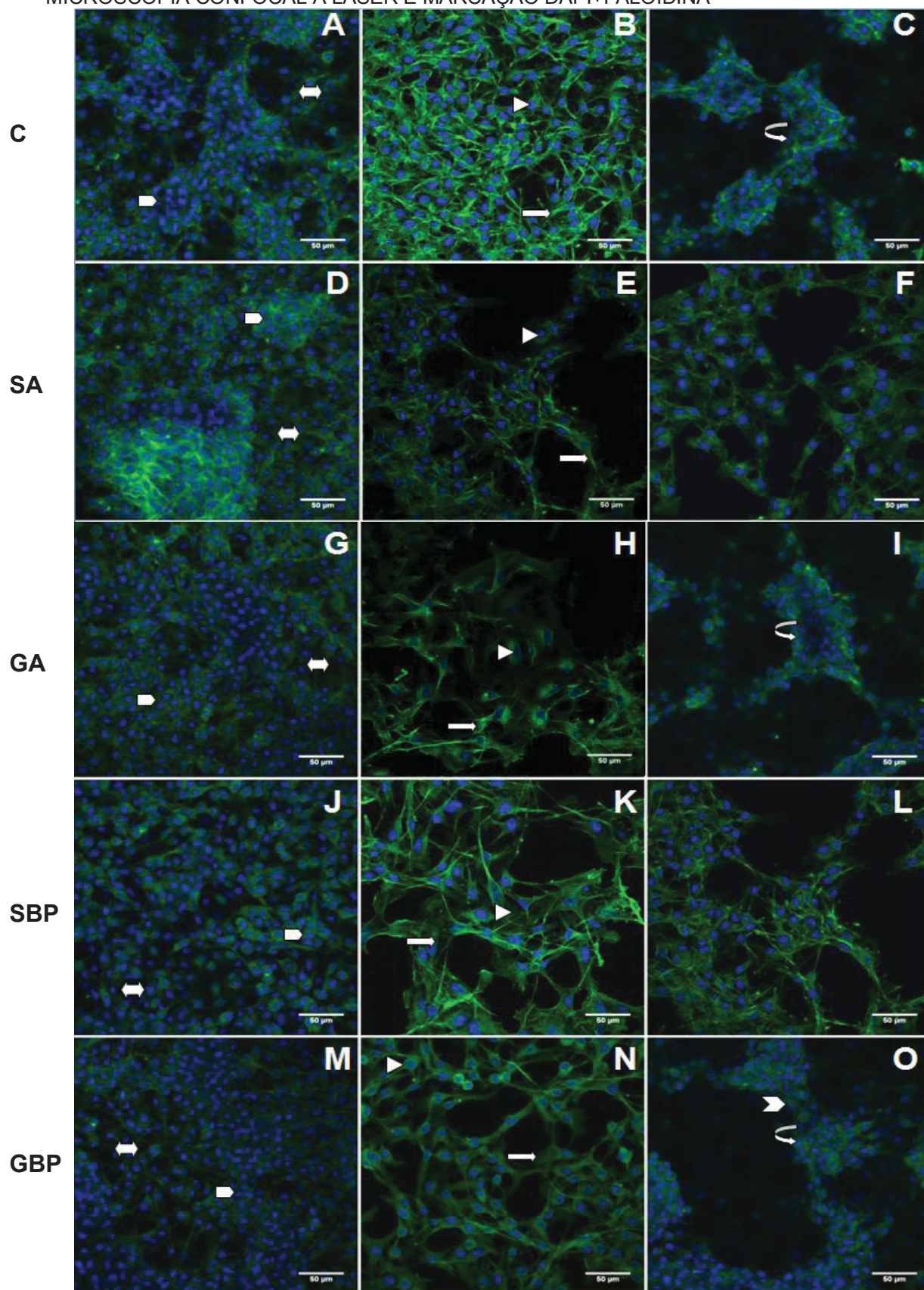
As células tratadas com SBP (imagens G, H) apresentam nódulos característicos, como vistos no controle, e destaca-se uma sub-população de células aderidas e espreiadas ao substrato, tal como para o tratamento com GBP. Porém, em GBP (imagens I e J) vemos células mais justapostas, fusionando-se entre si, sugerindo um aumento de adesão intercelular.

Dentre todos os tratamentos, o tratamento SA foi o que evidenciou, por análise ultra-estrutural de MEV, uma diferença no padrão do cultivo. Estas células, pela maior expansão do corpo celular e a íntima adesão ao substrato, sugerem estar mais estacionárias e conseqüentemente menos migratórias. Os tratamentos SBP e GBP também parecem induzir maior aglomeração celular.

4.5.2 Análise de núcleo e citoesqueleto por microscopia confocal a laser







Para esta técnica foi empregado corante fluorescente DAPI para evidenciar núcleos celulares (azul), e sonda faloidina para detectar um constituinte do citoesqueleto, os microfilamentos de actina (verde) (FIGURA 19). As imagens A, B e C representam células controle, mantidas em cultivo celular apenas em presença de meio. Podemos observar em menor magnitude (A) células empilhadas, sobrepondo-se umas às outras.

FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DO EFEITO DOS EXTRATOS E FRAÇÕES MICROALGAIS POR MICROSCOPIA CONFOCAL A LASER E MARCAÇÃO DAPI+FALOIDINA



NOTA: 5.000 células mantidas em cultivo celular, na presença ou ausência de tratamentos por 72 h. Todas as imagens estão no aumento de 40x. Imagens A, B, C: células-controle; D, E, F: células

tratadas com SA; G, H, I: células tratadas com GA; J, K, L: células tratadas com SBP; M, N, O: células tratadas com GBP. Para este ensaio a ação de cada tratamento sobre as células foi fotografada em duplicata de lâmina.

	Esta cabeça de seta identifica núcleo celular (DAP);
	Esta seta identifica microfilamentos de actina (faloidina);
	Esta seta identifica células empilhadas sobrepostas;
	Esta seta identifica áreas de maior coesão intercelular com formação de nódulos;
	Esta seta identifica células confluentes, aderidas, espiadas, sem inibição de contato;
	Esta cabeça de seta identifica nódulos com coesão entre si.

Também evidenciam-se áreas de maior coesão intercelular com formação de nódulos (C), bem como pode ser observado em plano inferior células aderidas, espiadas, sem inibição de contato, com menor justaposição, características de células tumorigênicas da linhagem B16-F10 (B). Observamos que essas células organizam seus microfilamentos de actina por toda a extensão do corpo celular, apresentando intensa marcação.

Estas características gerais, de empilhamento de células, com diferentes morfologias, mantendo coesão intercelular (nódulos) se assemelham ao observado para o tratamento GA (G, H, I).

Assim como no controle, as células expostas aos tratamentos SA (D, E, F) e SBP (J, K, L) também apresentam-se em subpopulações, ora sobrepostas (regiões de maior confluência), ora mais aderidas (regiões de menor confluência), mostrando semelhante coesão, espiamento e expansão do corpo celular. Porém, nas imagens F e L observa-se uma menor aglomeração celular, pela ausência de áreas nodulares aparentes, havendo um predomínio de células espiadas por sobre o substrato. Por meio desta técnica não foram revelados nódulos nas células expostas a SA e SBP, parecendo também haver menos justaposição ou maior espaçamento entre elas, além de uma maior expansão do corpo celular.

Para o tratamento com GBP (M, N, O), semelhante ao previamente observado na análise de MEV, observou-se uma maior subpopulação de células justapostas formando nódulos com coesão entre si, gerando grandes áreas nodulares interligadas.

4.6 MEDIÇÕES DE DINÂMICAS CELULARES EM CULTIVO

Após os testes de triagens iniciais relacionados principalmente à viabilidade celular, uma segunda bateria de ensaios foi realizada, agora no que tange o comportamento das células em cultivo, avaliando as dinâmicas de adesão e migração celular, dessa forma investigando mais a fundo o efeito dos extratos microalgais. Seguem os mesmos tratamentos (SA, GA, SBP e GBP na concentração $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) para estas próximas análises.

4.6.1 Ensaio de adesão a matrizes extracelulares

Em relação à capacidade de adesão celular sobre matrizes, foi constatado que apenas o tratamento GA reduziu em 24% a adesão em matrigel, enquanto os demais tratamentos não demonstraram efeito estatístico freando a adesão em matrigel, fibronectina, tampouco no controle, segundo ANOVA e teste t com $p < 0,05$ (FIGURAS 20 e 21).

FIGURA 20 - EFEITO DOS TRATAMENTOS MICROALGAIS NA ADESÃO CELULAR

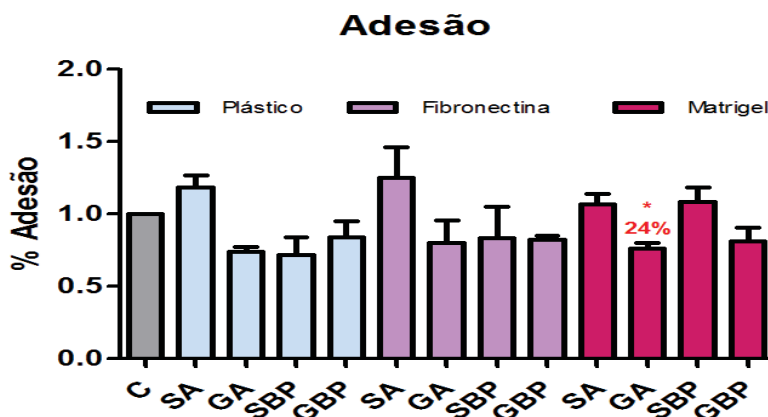
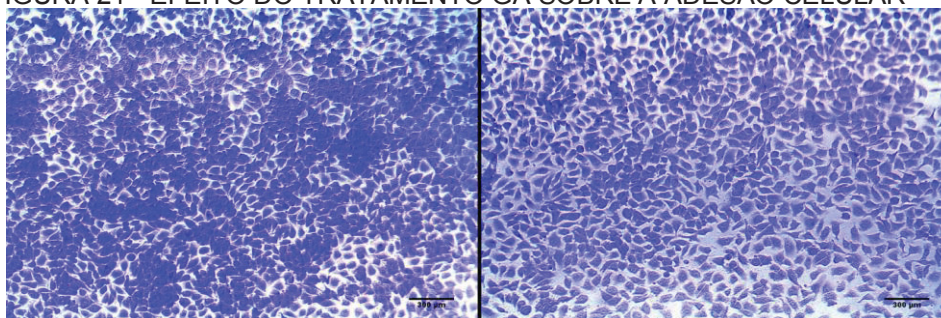


FIGURA 21 - EFEITO DO TRATAMENTO GA SOBRE A ADESÃO CELULAR



NOTA: Células B16-F10 coradas com cristal violeta, fotografadas em microscópio invertido (LEICA, MPS30)

4.6.2 Ensaio de Migração (*Scratching*)

Os dados do teste *Scratching* foram obtidos com auxílio do software T-Scratch para processamento e quantificação das fotos captadas no microscópio (FIGURA 22), pelos monitoramentos realizados de 2 em 2 horas. Com base na porcentagem de área coberta, comparando cada média de tempo do controle com a média do tempo dos tratamentos, foi gerado um gráfico (FIGURA 23) para visualização dos efeitos dos tratamentos SA, GA, SBP e GBP (todos em concentração $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre as células.

FIGURA 22 - FOTOS OBTIDAS NO EXPERIMENTO DE MIGRAÇÃO CELULAR

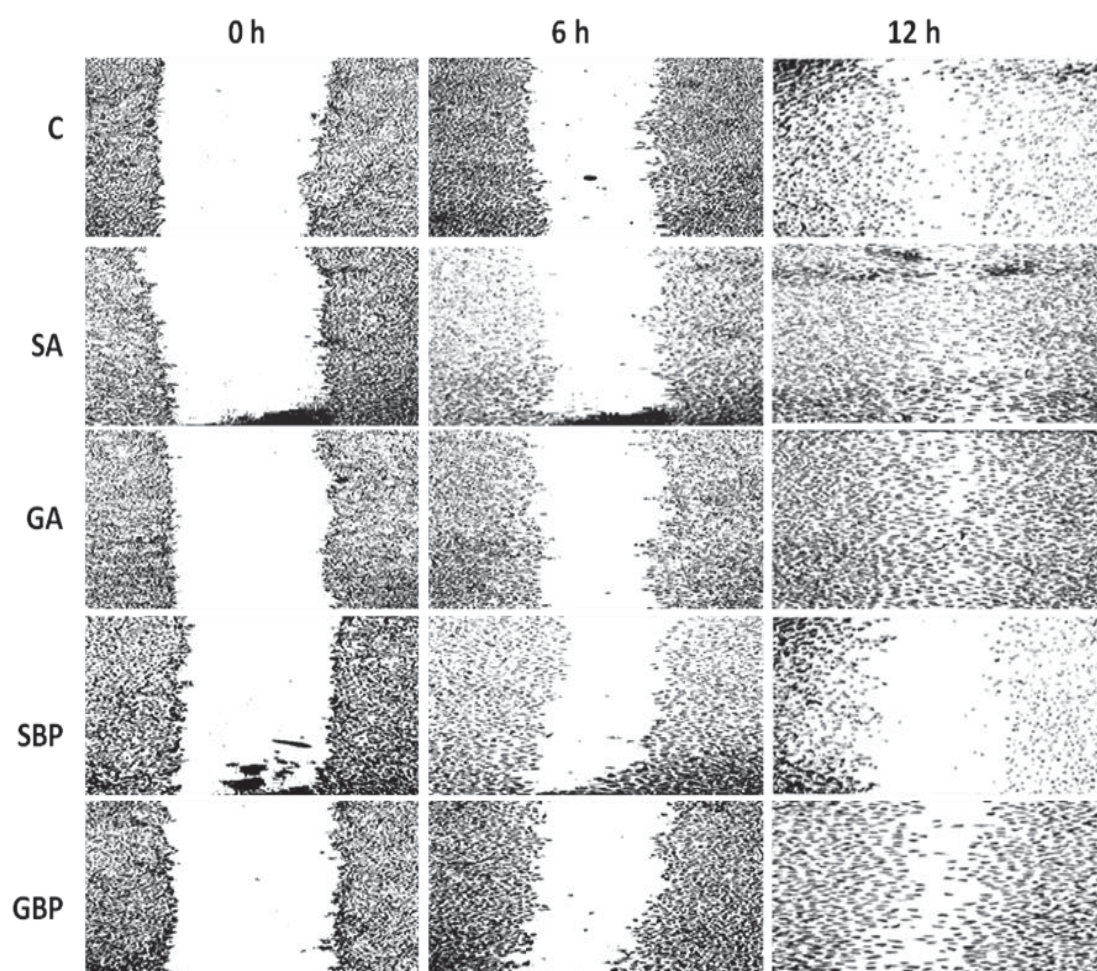
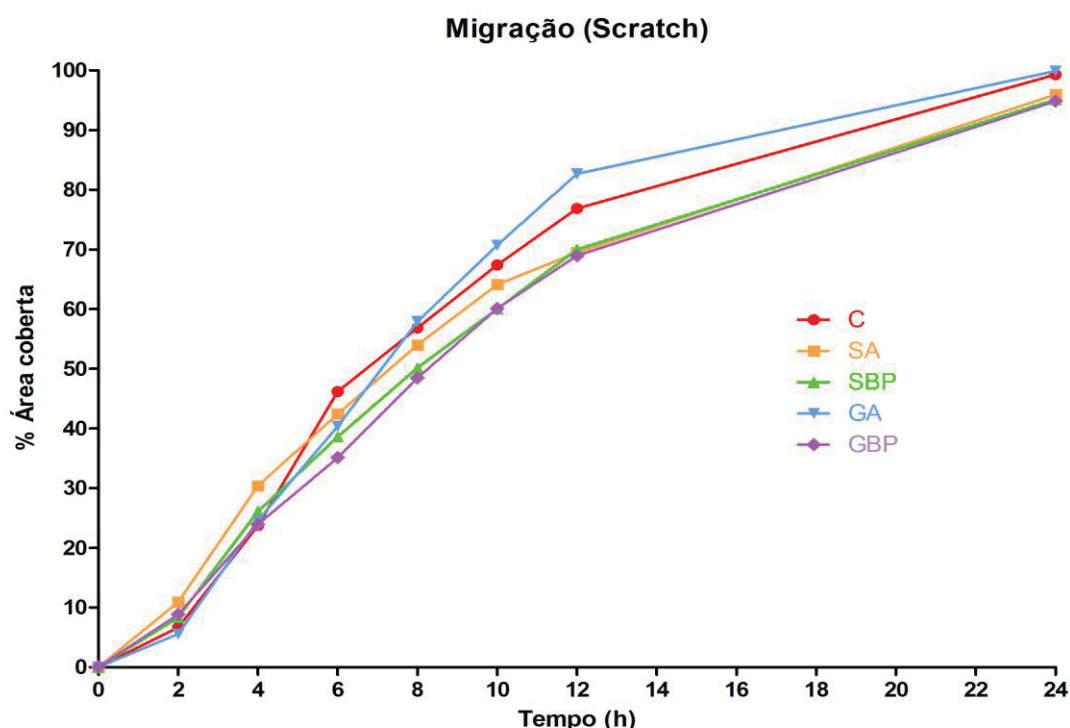


FIGURA 23 - EFEITO DOS TRATAMENTOS MICROALGAIS NA MIGRAÇÃO CELULAR



Ao observar o gráfico resultante (FIGURA 23) a princípio observam-se tendências nos tratamentos GBP, SBP e SA no sentido de reduzir a migração das células, no entanto os testes estatísticos (ANOVA e teste t) revelaram apenas GBP e SBP como efetivos em reduzir a migração (5%) a nível de significância $p < 0,05$.

Com este teste, a hipótese a confirmar era se os tratamentos seriam capazes de conter as células tumorais, reduzindo sua capacidade migratória, no que pôde-se constatar sutis efeitos nos tratamentos GBP e SBP. O próximo passo será averiguar se este efeito é dado pela perda de expressão de proteínas relacionadas ao processo de migração, pela redução de formação de colônias ou ainda por algum outro fator relacionado ao aumento da capacidade adesiva. Sabe-se que as proteínas de membrana que são exteriorizadas pelas células tumorais são determinantes tanto para a dinâmica de migração quanto adesão, pois é por meio delas que as células se comunicam entre si e exploram o substrato (CAMPBELL; HUMPHRIES, 2011).

Entre os receptores de superfície celular com maior atuação no processo migratório e invasivo estão as integrinas, mediando o contato com moléculas da matriz extracelular. Outra importante família de proteínas associadas a adesão célula-célula e também à motilidade celular é a das caderinas, por promoverem a

integridade de junções de adesão. Em melanomas, a diminuição de E-caderinas estimula a expressão de N-caderinas nos fibroblastos, células endoteliais e melanócitos normais, e observa-se a produção de fatores mitogênicos pelas próprias células tumorais (FERREIRA; ROCHA, 2004; TOLEDO, 2012). A glicoproteína CD44 também influencia a migração celular, ligando-se ao ácido hialurônico e várias outras moléculas, como colágeno, fibronectina, fibrinogênio, laminina e condroitin sulfato (WALLACH-DAYAN; ZAHALKA; SIONOV, 2008).

O que se sugere então como hipótese explicativa do efeito dos tratamentos SBP e GBP em frear a migração é que estejam modulando a expressão das proteínas citadas, apesar de ainda não ter-se realizado a análise. No entanto esses tratamentos não demonstraram efeito na adesão celular (no que pretende-se uma reavaliação), tampouco mostraram-se altamente citotóxicas, o que leva a necessidade de se investigar a fundo essas expressões de proteínas (caderinas e integrinas) e posteriormente, se necessário, avaliar os efeitos *in vivo*.

Quanto aos extratos não purificados SA, GA, SB, GB, SC, GC, observa-se um certo nível de citotoxicidade, sob alta concentração ($1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O extrato GA demonstrou redução na adesão celular, corroborando com a análise de MEV, também sendo uma possível explicação para o aumento na proliferação previamente observado no teste com Cristal Violeta em 48 h.

5 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos quanto a composição dos extratos e suas atividades, pôde-se concluir que:

- Os extratos de *D. subspicatus* (SA) e *M. gracile* (GA) obtidos a temperatura ambiente apresentam similaridade em termos de composição química monossacarídica aos extratos obtidos a 80 °C de *D. subspicatus* (SB) e *M. gracile* (GB), sendo compostos principalmente por glucose, manose e galactose. Foram identificadas as moléculas de glicosídeos sulfoquinovosil-glicerol, digalactosil-glicerol e monogalactosil-glicerol em SA, SB e GA, enquanto nos extratos a 80 °C de *M. gracile* (GB) e 120 °C de *D. subspicatus* (SC) foram encontrados apenas as moléculas de sulfoquinovosil-glicerol e digalactosil-glicerol;
- As frações purificadas de *D. subspicatus* (SBP) e *M. gracile* (GBP) apresentaram-se como diferentes tipos de polissacarídeos, sendo heteropolissacarídeos compostos principalmente por glucose, manose e ramnose (GBP); e ramnose, glucose, galactose, manose e fucose em similares proporções (SBP);
- Os extratos e frações, nas menores concentrações (10 e 100 µg.mL⁻¹) demonstraram baixa toxicidade (<30%) às células B16-F10, pelos testes Vermelho Neutro, Cristal Violeta e MTT; nenhum efeito sobre o ciclo celular; tampouco indução de morte celular por apoptose ou necrose;
- A segunda bateria de testes biológicos (morfologia, adesão e migração celular) revelou que o efeito de leve aumento na proliferação mostrado pelo extrato GA corrobora com seu efeito de redução na adesão celular, sendo este extrato considerado possivelmente estimulador às células tumorais, não sendo um bom candidato a agente terapêutico;

- As frações SBP e GBP demonstraram efeito discreto (5% a $p < 0,05$) na redução de migração celular, confirmado pela análise morfológica, onde as mesmas parecem causar maior aglomeração celular, fusionando-se entre si. Através das análises morfológicas, o extrato SA também mostrou causar um maior espraiamento das células, o que pode refletir uma vantagem à contenção tumoral. Estes 3 tratamentos foram então selecionados como os mais promissores para os próximos testes.

6 PERSPECTIVAS E SUGESTÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

- Prosseguir a caracterização química dos extratos e frações, com análises de RMN, de homogeneidade por HPSEC, e fracionamento dos extratos purificados, o que permitirá realizar a determinação da estrutura química dos polissacarídeos das microalgas *D. subspicatus* e *M. gracile*, visando atribuir as atividades biológicas às suas estruturas químicas;
- Investigar a expressão de proteínas de membrana nas células tumorais expostas aos tratamentos, bem como a formação de colônias;
- Avaliar a migração celular através de microscopia confocal a laser *overnight*, o que permitirá acompanhar de forma mais detalhada a completa cobertura da área e o momento exato da confluência, visando a reprodução do observado no presente trabalho pelo teste *Scratching*.

REFERÊNCIAS

ABD EL BAKY, H. H.; EL-BAROTY, G. S.; IBRAHIM, E. A. Antiproliferation and antioxidant properties of lipid extracts of the microalgae *Scenedesmus obliquus* grown under stress conditions. **Der Pharma Chemica**, v. 6, n. 5, p. 24–34, 2014.

ABU, R. et al. Anti-metastatic effects of the sulfated polysaccharide ascophyllan isolated from *Ascophyllum nodosum* on B16 melanoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 458, n. 4, p. 727–732, 2015.

ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular**. 2. ed. Porto Alegre: [s.n.].

ALE, M. T. et al. Fucose-containing sulfated polysaccharides from brown seaweeds inhibit proliferation of melanoma cells and induce apoptosis by activation of caspase-3 *in vitro*. **Marine Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2605–2621, 2011.

ALGAEBASE. Disponível em:

<<http://www.algaebase.org/browse/taxonomy/?id=90759>>. Acesso em: 29 mar. 2018a.

ALGAEBASE. Disponível em: <

<http://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=42443>. Acesso em: 17/04/2018b.

ALVES, A.; SOUSA, R. A.; REIS, R. L. A practical perspective on ulvan extracted from green algae. **Journal of Applied Phycology**, v. 25, n. 2, p. 407–424, 2013.

AMARO, H. M.; GUEDES, A. C.; MALCATA, F. X. Antimicrobial activities of microalgae: an invited review. **Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances**, p. 1272–1280, 2011.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2018. Melanoma Skin Cancer: Survival rates for melanoma skin cancer, by stage. American Cancer Society. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/melanoma-skin-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates-for-melanoma-skin-cancer-by-stage.html>>. Acesso em: 15/03/2018.

ANISIMOVA, N. Y. et al. Influence of fucoidans and their derivatives on antitumor and phagocytic activity of human blood leucocytes. **Biochemistry (Moscow)**, v. 80, n. 7, p. 925–933, 2015.

ASPINALL, G. O. Classification of Polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. [s.l.] Elsevier, 1983. p. 1–9.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 12648**: Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 2011.

BALBOA, E. M. et al. ***In vitro* antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae** *Food Chemistry* Elsevier, , 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814612017530>>. Acesso em: 16/4/2018

BAO, X. et al. Structural and immunological studies of a major polysaccharide from spores of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst. **Carbohydrate Research**, v. 332, n. 1, p. 67–74, 2001.

BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology**. 2. ed. London: CRC press, 2014.

BBC BRASIL, 2016. Dez gráficos que explicam o impacto do câncer no mundo. Disponível em: http://www.bbc.com/portuguese/noticias/2016/02/160204_gch_graficos_cancer_fn>. Acesso em 19/04/2017

BERTOLDI, F.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **B. Ceppa**, v. 26, n. 1, p. 9–20, 2008.

BHAT, V. B.; MADYASTHA, K. M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis* : Protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 285, n. 2, p. 262–266, 2001.

BICUDO, C. E. D. M.; MENEZES, M. **Gêneros de Algas de Águas Continentais do Brasil (chave para identificação e descrições)**. 2^a edição ed. São Carlos: RiMa, 2006.

BISCAIA, S. M. P. et al. Safe therapeutics of murine melanoma model using a novel antineoplastic, the partially methylated mannogalactan from *Pleurotus eryngii*. **Carbohydrate Polymers**, v. 178, p. 95–104, 2017.

BOHN, J. A.; BEMILLER, J. N. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydrate Polymers**, v. 28, n. 1, p. 3–14, 1995.

BORGES, J. A. et al. *Spirulina sp.* LEB-18 culture using effluent from the anaerobic digestion. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 30, n. 2, p. 277–287, 2013.

BOROWITZKA, M. A. Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically-active compounds. **Journal of Applied Phycology**, v. 7, n. 1, p. 3–15, 1995.

CAMPBELL, I. D.; HUMPHRIES, M. J. Integrin structure, activation, and interactions. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 3, p. 1–14, 2011.

CARDOSO, E. H. B. S. et al. Atividade antimicrobiana do extrato de *Scenedesmus sp.* frente a cepas de mastite caprina. **Xiii Jornada De Ensino, Pesquisa E**

Extensão, p. 16–18, 2013.

CARVALHO, L. R. et al. Biologically active compounds from cyanobacteria extracts: *in vivo* and *in vitro* aspects. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 471–480, 2013.

CASSIDY, J.; BISSETT, D.; OBE, R. A. S. **Oxford handbook of oncology**. New York: [s.n.].

CHAIKLAHAN, R. et al. Polysaccharide extraction from *Spirulina sp.* and its antioxidant capacity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 58, p. 73–78, 2013.

CHEN, C. Y. et al. Phototrophic hydrogen production in photobioreactors coupled with solar-energy-excited optical fibers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, n. 23, p. 6886–6895, 2008.

CHODAT, R. Scenedesmus : Etude de génétique, de systématique expérimentale et d'hydrobiologie. **Schweizerischel Zeitschrift fur Hydrologie**, v. 3, p. 71–258, 1926.

CHOJNACKA, K.; KIM, S. Introduction of Marine Algae Extracts. In: **Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications**. p. 1–14.

COGNE, G.; CORNET, J. F.; GROS, J. B. Design, operation, and modeling of a membrane photobioreactor to study the growth of the cyanobacterium *Arthrospira platensis* in space conditions. **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 3, p. 741–750, 2005.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: Estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47–58, 2010.

CROCI, D. O. et al. Fucans, but not fucomannoglucuronans, determine the biological activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria saccharina* brown seaweed. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

DAMONTE, E.; MATULEWICZ, M.; CEREZO, A. Sulfated seaweed polysaccharides as antiviral agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 18, p. 2399–2419, 2004.

DEMIRBAS, A. Use of algae as biofuel sources. **Energy Conversion and Management**, v. 51, n. 12, p. 2738–2749, 2010.

DILLON, H. . et al. **Microalgae derived compositions for improving the health and appearance of skin**. US 8277849 B2, 2012.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350–356, 1956.

DULBECCO, R.; FREEMAN, G. **Plaque production by the polyoma virus** *Virology* Academic Press, , 1959. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682259900431?via%3Dihub>>
 . Acesso em: 16/4/2018

DUVOIX, A. et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. **Cancer Letters**, v. 223, n. 2, p. 181–190, 2005.

DYERSBURG SKIN AND ALLERGY CLINIC, 2018. The ABCDs of detecting melanoma. Disponível em: <<https://goo.gl/NqbgfL>>. Acesso em: 19/04/2018.

EL-BAKY, H. H. A.; EL-BAROTY, G. S. Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances. **Journal of Aquatic Science**, v. 1, n. 1, p. 11–23, 2013.

EL-BAZ, F. K. et al. Anticarcinogenic activity of algal extracts. **JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE**, v. 2, n. 5–6, p. 243–251, 2002.

ELSOHLY, M. et al. **Potent Immunostimulatory from Microalgae**. US 2007/0264271 A1, 2007. a.

ELSOHLY, M. et al. **Potent imunostimulants from microalgae**. US 2007/0059317 A1, 2007. b.

ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, B. P.; FRESNO, A. M. V. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco**, v. 56, n. 5–7, p. 497–500, 2001.

FARVIN, K. H. S.; JACOBSEN, C. Phenolic compounds and antioxidant activities of selected species of seaweeds from Danish coast. **Food Chemistry**, v. 138, n. 2–3, p. 1670–1681, 2013.

FERNANDES, T. et al. Marine microalgae monosaccharide fluctuations as a stress response to nutrients inputs. **Algal Research**, v. 24, n. Part A, p. 340–346, 2017.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. C. **Oncologia molecular**. Rio de Janeiro: [s.n.].

FIORESI, T. B.; TAVARES, L. H. S. Cultivo de *Ankistrodesmus gracilis* (Chlorophyta) em laboratório à base de esterco suíno. **Biotemas**, v. 21, n. 1, p. 7–16, 2008.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171–177, 2006.

FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4144–4150, 2010.

FRANCESCHINI, I.M. BURLIGA, A. L. et al. **Algas: uma abordagem filogenética, taxonomica e ecológica**. Porto Alegre: [s.n.].

GAGO, A. S. **Compostos bioativos de microalgas com interesse no tratamento da diabetes**. 49 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana)- Setor

de Ciencias e Tecnologia, Universidade do Algarve, Portugal, 2016.

GEDOUIN, J.; VALLEE, R. **Utilization of natural algae extracts for making a product intended to prevent and care for diseases of the skin**. US 6.197.303 B1, 2001.

GHOSH, T. et al. Focus on antivirally active sulfated polysaccharides: From structure-activity analysis to clinical evaluation. **Glycobiology**, v. 19, n. 1, p. 2–15, 2009.

GILLIES, R. J.; DIDIER, N.; DENTON, M. Determination of cell number in monolayer cultures. **Analytical Biochemistry**, v. 159, n. 1, p. 109–113, 1986.

GOUVEIA, L.; OLIVEIRA, A. C. Microalgae as a raw material for biofuels production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 269–274, 2009.

GRANUM, E.; KIRKVOLD, S.; MYKLESTAD, S. M. Cellular and extracellular production of carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: Diel variations and effects of N depletion. **Marine Ecology Progress Series**, v. 242, n. September, p. 83–94, 2002.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of high added-value compounds - A brief review of recent work. **Biotechnology Progress**, v. 27, n. 3, p. 597–613, 2011a.

GUEDES, A. C.; AMARO, H. M.; MALCATA, F. X. Microalgae as sources of carotenoids. **Marine Drugs**, v. 9, n. 4, p. 625–644, 2011b.

HASUI, M. et al. In vitro antiviral activities of sulfated polysaccharides from a marine microalga (*Cochlodinium polykrikoides*) against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, n. 5, p. 293–297, 1995.

HEGEWALD, E. Eine neue Unterteilung der Gattung *Scenedesmus* Meyen. **Nova Hedwigia**, v. 30, p. 343–376, 1978.

HEGEWALD, E. New combinations in the genus *Desmodesmus*. **Algological Studies**, v. 96, n. January, p. 1–18, 2000.

HILDENBRAND, G. L. G. et al. Five-year survival rates of melanoma patients treated by diet therapy after the manner of gerson: A retrospective review. **Alternative Ther Health Med**, v. 1, n. 4, p. 29–37, 1995.

HOA, L. T. P. et al. Isolating and Screening Mangrove Microalgae for Anticancer Activity. **Research Journal of Phytochemistryjournal of Phytochemistry**, v. 5, n. 3, p. 156–162, 2011.

HUANG, C. **Novel method to generate bioactive compounds in algae**. US 2011/0097770 A1, 2011.

HUNTER, S. A.; BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345–358, 2016.

IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 4, p. 703–709, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2018.
Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>> Acesso em: 24/03/2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), 2011. ABC do câncer. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/livro_abc_2ed.pdf> Acesso em: 02/04/2018.

ISSARAPAYUP, K.; POWTONGSOOK, S.; PAVASANT, P. Flat panel airlift photobioreactors for cultivation of vegetative cells of microalga *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 142, n. 3–4, p. 227–232, 2009.

JADHAV, J. P. et al. Decolourization of azo dye methyl red by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. **Chemosphere**, v. 68, n. 2, p. 394–400, 2007.

JANOSKA, A. et al. A liquid foam-bed photobioreactor for microalgae production. **Chemical Engineering Journal**, v. 313, p. 1206–1214, 2017.

Jl, F. et al. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus sp.* in anaerobic digestion wastewater. **Bioresource Technology**, v. 161, p. 200–207, 2014.

JIAO, L. et al. Characterization and anti-tumor activity of alkali-extracted polysaccharide from *Enteromorpha intestinalis*. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 3, p. 324–329, 2009.

JIN, J. O. et al. Fucoidan can function as an adjuvant in vivo to enhance dendritic cell maturation and function and promote antigen-specific T cell immune responses. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–10, 2014.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 621–623, 2001.

KHORSHID, F. A.; RAHIMALDEEN, S. A.; AL-AMRI, J. S. Apoptosis study on the effect of PMF on different cancer cells. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 150–155, 2011.

KIM, Y. T. et al. Structural characterization of β -D-(1 \rightarrow 3, 1 \rightarrow 6)-linked glucans using NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 328, n. 3, p. 331–341, 2000.

KORSHIKOV, A. A. **Viznachnik prsnovodnihk vodorostey Ukrainsykoï RSR [Vyp] V. Pidklas Protokokovi (Protococcineae). Bakuol'ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales) [The Freshwater Algae of the Ukrainian SSR, 1953.**

KOSMELA, P. et al. Liquefaction of macroalgae *Enteromorpha* biomass for the preparation of biopolyols by using crude glycerol. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 56, p. 399–406, 2017.

KOYANAGI, S. et al. Oversulfation of fucoidan enhances its anti-angiogenic and antitumor activities. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 173–179, 2003.

LAMBERT, J. D. et al. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **The American journal of clinical nutrition**, v. 81, n. 1, p. 284–291, 2005.

LAU, E. et al. The transcription factor ATF2 promotes melanoma metastasis by suppressing protein fucosylation. **Science Signaling**, v. 8, n. 406, p. 1–12, 2015.

LAZOVICH, D. et al. Indoor tanning and risk of melanoma: A case-control study in a highly exposed population. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 19, n. 6, p. 1557–1568, 2010.

LEE, C. G.; PALSSON, B. Light emitting diode-based algal photobioreactor with external gas exchange. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 3, p. 257–263, 1995.

LEHNINGER, A.; NELSON, D. L. **Princípios da Bioquímica**. 6. ed. New York: [s.n.].
MACIEL, M. A. M. et al. Aspectos sobre Produtos Naturais na Descoberta de Novos Agentes Antitumorais e Antimutagênicos. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 3, n. 1, p. 38–59, 2013.

MAEDA, H. et al. Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 332, n. 2, p. 392–397, 2005.

MALBURG, B. V. **Identificação de fitohormônios no extrato com potencial biotecnológico da microalga *Scenedesmus subspicatus***. 102 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

MAZEPA, E. **Potencial atividade bioestimulante vegetal do extrato aquoso da microalga *Scenedesmus subspicatus***. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências-Bioquímica) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

MAZUR, H.; KONOP, A.; SYNAK, R. Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. **Journal of Applied Phycology**, v. 13, n. 1, p. 35–42, 2001.

MECCHERI, F. S. **Diversidade e possíveis aplicações quimiotaxonômicas dos**

polissacarídeos extracelulares de microalgas verdes cocoides. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, 2016.

MEYLE, K. D.; GULDBERG, P. Genetic risk factors for melanoma. **Human Genetics**, v. 126, n. 4, p. 499–510, 2009.

MIAO, H. Q. et al. Inhibition of heparanase activity and tumor metastasis by laminarin sulfate and synthetic phosphorothioate oligodeoxynucleotides. **International Journal of Cancer**, v. 83, n. 3, p. 424–431, 1999.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences**, v. 15, n. 2, p. 160–176, 2015.

MILANO, J. et al. Microalgae biofuels as an alternative to fossil fuel for power generation. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 58, p. 180–197, 2016.

MILLEN, A. E. et al. Diet and melanoma in a case-control study. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 13, n. 6, p. 1042–1051, 2004.

MIMOUNI, V. et al. The potential of microalgae for the Production of Bioactive molecules of pharmaceutical interest. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 15, p. 2733–2750, 2012.

MÓGOR, G. et al. **Ação bioestimulante vegetal do extrato e suspensões de microalga *Scenedesmus subspicatus***. PI 1107211-32011, 2011.

MOHD SYAHRIL M.Z.; ROSHANI O.; NURHASYIMAH R.; et al. Screening of anticancer activities of crude extracts of unicellular green algae (*Chlorella vulgaris*) and filamentous blue green algae (*Spirulina platensis*) on selected cancer cell lines. **International Conference on Applied Sciences, Mathematics and Humanities**. 2011.

MORAIS, M. G. et al. Review Article Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–15, 2015.

MOREAU, D. et al. Cultivated microalgae and the carotenoid fucoxanthin from *Odontella aurita* as potent anti-proliferative agents in bronchopulmonary and epithelial cell lines. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 22, n. 1, p. 97–103, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOTOKAWA, T. et al. Effect of Val92Met and Arg163Gln variants of the *MC1R* gene on freckles and solar lentigines in Japanese. **Pigment Cell Research**, v. 20, n. 2, p. 140–143, 2007.

NOBRE, B. P. et al. A biorefinery from *Nannochloropsis* sp. microalga - Extraction of oils and pigments. Production of biohydrogen from the leftover biomass. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 128–136, 2013.

NODA, K. et al. A water-soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. **Planta Medica**, v. 62, n. 5, p. 423–426, 1996.

NOSEDA, M. D. et al. **Fotobiorreator para cultivo de micro-organismos fotossintetizantes**. BR1020160294851, 2016.

OLIVEIRA, A. C. **Cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* visando a atividade bioestimulante vegetal**. 177 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) - Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

ÖRDÖG, V. et al. Screening microalgae for some potentially useful agricultural and pharmaceutical secondary metabolites. **Journal of Applied Phycology**, v. 16, n. 4, p. 309–314, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2018. Câncer. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 12/03/2018.

PAINTER, T. J. Algal Polysaccharides. In: **The Polysaccharides**. [s.l.] Elsevier, 1983. p. 195–285.

PASCO, D.; PUGH, N. **Potent immunostimulatory extracts from microalgae**. US 7846452 B2, 2010.

PHO, L.; GROSSMAN, D.; LEACHMAN, S. A. Melanoma genetics: A review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. **Current Opinion in Oncology**, v. 18, n. 2, p. 173–179, 2006.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, n. 1, p. 45–61, 2002.

POLSKY, D. et al. The transcriptional repressor of *p16/Ink4a*, Id1, is up-regulated in early melanomas. **Cancer Research**, v. 61, n. 16, p. 6008–6011, 2001.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review. **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.

PROTIST INFORMATION SERVER, 2018. Disponível em: <<http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB/Images/Chlorophyta/Selenastrum/gracile/gracile12.html>>. Acesso em: 12/02/2018.

PUBMED, 2018. Algae and Melanoma. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=algae+and+melanoma>>. Acesso em: 15/03/2018.

PUGH, N. et al. Isolation of three high molecular weight polysaccharide preparations

with potent immunostimulatory activity from *Spirulina platensis*, *aphanizomenon flos-aquae* and *Chlorella pyrenoidosa*. **Planta Med**, v. 67, n. 2, p. 737–742, 2001.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 635–648, 2004.

QUAH, C. C. et al. Pigmentation and dermal conservative effects of the astonishing algae *Sargassum polycystum* and *Padina tenuis* on guinea pigs, Human epidermal melanocytes (HEM) and chang cells. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 11, n. 4, p. 77–83, 2014.

RAPOSO, M. F. J.; MORAIS, A. M. B.; MORAIS, R. M. S. C. Marine polysaccharides from algae with potential biomedical applications. **Marine Drugs**, v. 13, n. 5, p. 2967–3028, 2015.

REBECCA, V. W.; SONDAK, V. K.; SMALLEY, K. S. M. A brief history of melanoma: From mummies to mutations. **Melanoma Research**, v. 22, n. 2, p. 114–122, 2012.

REINSCH, P. F. **Abhandlungen der Naturhistorischen Gesellschaft Nürnberg**, 1866. Disponível em: <<http://www.biodiversitylibrary.org/item/91619>>

REYNA-MARTINEZ, R. et al. Antitumor activity of *Chlorella sorokiniana* and *Scenedesmus* sp. microalgae native of Nuevo León State, México. **PeerJ**, v. 6, p. e4358, 2018.

RIZZI, J. **Potencial biotecnológico dos polissacarídeos de microalgas marinhas**. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Bioquímica) - Setor de Ciências biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

ROCHA, F. D. et al. Potential cytotoxic activity of some Brazilian seaweeds on human melanoma cells. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 170–175, 2009.

ROCHA, H. A. O. et al. Fucan inhibits chinese hamster ovary cell (CHO) adhesion to fibronectin by binding to the extracellular matrix. **Planta Medica**, v. 71, n. 7, p. 628–633, 2005.

ROY, A. B.; HEWLINS, M. J. E. An improved preparation of cyclohexylammonium allyl and D-glycer-1'-yl 6-deoxy-6-C-sulfonato- α -D-glucopyranosides. **Carbohydrate Research**, v. 310, n. 3, p. 173–176, 1998.

RUBERTO, G.; TRINGALI, C. Secondary metabolites from the leaves of *Feijoa sellowiana* Berg. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21 SPEC. ISS., p. 2947–2951, 2004.

SASSAKI, G. L. et al. Glycosyldiacylglycerolipids from the lichen *Dictyonema glabratum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 6, p. 844–847, 1999.

SHANAB, S. M.; MOSTAFA, S. S. M.; SHALABY, E. A.; et al. **Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities**. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. 2012.

SCHERER, M. D. et al. Environmental study of producing microalgal biomass and bioremediation of cattle manure effluents by microalgae cultivation. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 19, n. 6, p. 1745–1759, 2017.

SEZER, A. D. et al. Chitosan film containing fucoidan as a wound dressing for dermal burn healing: Preparation and in vitro/in vivo evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 8, n. 2, p. E94–E101, 2007.

SHANAB, S. M. M. et al. Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 608–615, 2012.

SHIBATA, H. et al. Preventive effects of *Cladosiphon* fucoidan against *Helicobacter pylori* infection in Mongolian gerbils. **Helicobacter**, v. 8, n. 1, p. 59–65, 2003.

SHIGEAKI, M. et al. **Polyssaccharides and antiviral drugs containing the same as active ingredients**. 88305575.8, 1988.

SHUBERT, E.; WILK-WOŹNIAK, E.; LIGEZA, S. An autecological investigation of *Desmodesmus*: implications for ecology and taxonomy. **Plant Ecology and Evolution**, v. 147, n. 2, p. 202–212, 2014.

SILVA, T. G. et al. Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): rbcL, 18S rDNA and ITS–2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum* gen. nov. and *Curvastrum* gen. nov. **Fottea**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2017.

SIVAN, A. et al. Commensal *Bifidobacterium* promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. **Science**, v. 350, n. 6264, p. 1084–1089, 2015.

SMITH, V. J.; DESBOIS, A. P.; DYRYNDA, E. A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1213–1262, 2010.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DERMATOLOGIA (SBD) 2017. Câncer de Pele. Disponível em: <<http://www.sbd.org.br/dermatologia/pele/doencas-e-problemas/cancer-da-pele/64/>> Acesso em: 28/03/2018.

SPOLAORE, P. et al. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.

STANLEY, P. D. et al. **Potent imunostimulants from microalgae**. 20030069974 A, 2003.

STIRK, W. A. et al. Auxin and cytokinin relationships in 24 microalgal strains1. **Journal of Phycology**, v. 49, n. 3, p. 459–467, 2013a.

STIRK, W. A. et al. Hormone profiles in microalgae: Gibberellins and brassinosteroids. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 70, p. 348–353, 2013b.

SUALI, E.; SARBATLY, R. Conversion of microalgae to biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 6, p. 4316–4342, 2012.

SUAREZ, E. R. et al. **Compositions obtained from Chlorella extract having immunomodulating properties**. US 2011/0104189 A1, 2011.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; REDDANNA, P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro. **Cancer Letters**, v. 224, n. 1, p. 31–43, 2005.

SWEET, M. et al. Evidence of melanoma in wild marine fish populations. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

TALYSHINSKY, M. M.; SOUPRUN, Y. Y.; HULEIHEL, M. M. Anti-viral activity of red microalgal polysaccharides against. **Cancer Cell International**, v. 2, n. 8, p. 14–17, 2002.

TEAS, J.; IRHIMEH, M. R. Melanoma and brown seaweed: an integrative hypothesis. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, n. 2, p. 941–948, 2017.

TERUYA, T. et al. Anti-proliferative activity of oversulfated fucoidan from commercially cultured *Cladosiphon okamuranus* TOKIDA in U937 cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 3, p. 221–226, 2007.

TERUYA, T. et al. Structural characteristics and in vitro macrophage activation of acetyl fucoidan from *Cladosiphon okamuranus*. **Glycoconjugate Journal**, v. 26, n. 8, p. 1019–1028, 2009.

TOLEDO, D. C. **Fatores genéticos e moleculares relacionados ao melanoma (Revisão da Literatura)** Goiânia, 2012.

TORRES, M. R.; SOUSA, A. P. A.; DA SILVA FILHO, E. A. T.; et al. **Atividade biológica de extratos orgânicos e aquosos de macroalgas marinhas do Estado do Ceará, Brasil**. Arq. Ciên. Mar, Fortaleza, 2005, 38: 55 - 63.

UMAMAHESWARI, A.; GOVINDAN, N. Anticancerous effect of *Hibiscus sabdariffa* leaves on hepatocellular carcinoma cell line Hep 3B. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 1, n. 3, p. 100–105, 2007.

VANGELOS, R. Are prescription drug prices high? **Science**, v. 252, p. 1080–1084, 1991.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química antrópica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139–145, 2004.

VISHCHUK, O. et al. Structural characteristics and biological activity of fucoidans from the brown algae *Alaria sp.* and *Saccharina japonica* of different reproductive status. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, n. 4, p. 817–828, 2012.

WALLACH-DAYAN, S. B.; ZAHALKA, A.; SIONOV, R. V. Involvement of CD44, a

molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 2007, p. 260–267, 2008.

WANG, Y. et al. In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. **Nutrition Research**, v. 26, n. 11, p. 597–603, 2006.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: [s.n.].

WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y. J. **Biological activities and potential industrial applications of fucose rich sulfated polysaccharides and fucoidans isolated from brown seaweeds: A review**. **Carbohydrate Polymers**. Elsevier, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861711011441>>. Acesso em: 16/4/2018.

WILLIAMS, C. D. et al. A high ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acids is associated with increased risk of prostate cancer. **Nutrition Research**, v. 31, n. 1, p. 1–8, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018. Ultraviolet radiation (UV): Skin cancers, Who is most at risk of getting skin cancer?. Disponível em: <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index2.html>>. Acesso em: 18/03/2018.

YAJIMA, I. et al. Molecular network associated with MITF in skin melanoma development and progression. **Journal of Skin Cancer**, p. 1–7, 2011.

YIM, J. H. et al. Characterization of a novel bioflocculant, p-KG03, from a marine dinoflagellate, *Gyrodinium impudicum* KG03. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 2, p. 361–367, 2007.

ZHAO, P. et al. The influence of different flocculants on the physiological activity and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum*. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 681–687, 2014.